

Aus der Orthopädischen Klinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Maximilian Rudert

**Signalwege und Biomarker für die Adaptation mesenchymaler Gewebe
an physikalische Kräfte**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Frederik Paul Vincent Glöckner
aus Würzburg

Würzburg, Dezember 2019

Referent: Prof. Dr. med. Franz Jakob

Korreferent: Prof. Dr. med. Martin Fassnacht

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Juli 2020

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Anatomische und histologische Grundlagen	2
1.1.1	Knochengewebe	2
1.1.2	Muskelgewebe.....	3
1.2	Adaptation mesenchymaler Gewebe	6
1.2.1	Mechanosensing.....	6
1.2.2	Mechanotransduktion	7
1.2.3	Adaptationsvorgänge im Knochengewebe	7
1.2.4	Adaptationsvorgänge im Muskelgewebe.....	8
1.3	Biomarker im Serum als Reaktion auf physikalische Reize – körperliches Training	11
1.3.1	Myostatin/ Follistatin/ Follistatin-like-3.....	13
1.3.2	Interleukin 6 und Interleukin 8.....	15
1.3.3	Klotho.....	17
1.3.4	Steroidhormone	17
1.4	Zielsetzung	20
2	Material und Methoden.....	22
2.1	Probanden.....	22
2.2	Durchführung der klinischen Studie	23
2.2.1	Fragebogen	23
2.2.2	Erhebung der Basisparameter	25
2.2.3	Bioimpedanzanalyse	26
2.2.4	Fahrradergometertest	27
2.2.5	Borg-Skala	29
2.2.6	Ruhephase	29
2.2.7	Blutentnahme	30
2.2.8	Glukose- und Lactatbestimmung.....	30
2.3	Durchführung der Laboruntersuchung.....	32
2.3.1	ELISA	32
2.3.1.1	Myostatin und Klotho.....	35
2.3.1.2	Follistatin	36
2.3.1.3	Follistatin-Like-3	36

2.3.1.4	Interleukin 6	36
2.3.1.5	Interleukin 8	37
2.3.2	Steroidpanel	37
2.4	Statistische Auswertung	38
3	Ergebnisse	39
3.1	Probandenklientel.....	39
3.1.1	Bioimpedanzanalyse.....	40
3.2	Reaktion auf physikalisches Training	42
3.2.1	Kardiovaskuläre Anpassung.....	42
3.2.2	Metabolische Anpassung.....	43
3.2.3	Borg-Skala	44
3.2.4	Hormonelle Anpassung	44
3.2.4.1	Aldosteron	44
3.2.4.2	Kortisol	45
3.3	Biomarker.....	47
3.3.1	Myostatin.....	47
3.3.2	Follistatin	49
3.3.3	Follistatin-like-3	50
3.3.4	Interleukin 6.....	51
3.3.5	Interleukin 8.....	52
3.3.6	Klotho.....	53
3.4	Korrelationen	54
3.4.1	Myostatin/ Follistatin/ Follistatin-like-3.....	54
3.4.2	Interleukin 6 und Interleukin 8.....	57
3.4.3	Klotho.....	60
4	Diskussion.....	61
4.1	Probandenklientel.....	61
4.1.1	Bioimpedanzanalyse.....	62
4.2	Studienaufbau.....	63
4.2.1	Fahrradergometertest	63
Nachweis einer Belastungssituation		64
4.2.2	Blutentnahme	65
4.3	Biomarker in Ruhe	66
4.4	Biomarker nach Belastung	68

4.4.1	Funktionsweise klassischen endokrinen Gewebes	68
4.4.2	Endokrine Funktionsweise des Muskelgewebes.....	69
4.4.3	Einzelne Biomarker	71
4.4.3.1	MSTN/ FST/ FSTL3	71
4.4.3.2	IL-6/ IL-8.....	74
4.4.3.3	Klotho	76
4.5	Limitationen	78
4.5.1	Probandenklientel	78
4.5.2	Studiendurchführung	78
4.6	Ausblick	80
5	Zusammenfassung.....	81
6	Verzeichnisse.....	83
6.1	Abkürzungsverzeichnis	83
6.2	Abbildungsverzeichnis	86
6.3	Literaturverzeichnis	88
7	Anhang	
8	Danksagung	
9	Lebenslauf	

1 Einleitung

Der menschliche Organismus kann nur bestehen, weil für unterschiedliche Gewebe Anpassungsmechanismen existieren, die es dem Körper ermöglichen auf eine veränderte Belastungssituation entsprechend zu reagieren. Diese fallen natürlich ganz unterschiedlich aus.

Für die Bewältigung einer akuten Belastung, wie sie zum Beispiel bei sportlicher Aktivität auftritt, gibt es akute Anpassungsreaktion des Körpers. Diese bestehen unter anderem aus Anpassungen im Kreislaufsystem um den gesteigerten Sauerstoff- und Energiebedarf der arbeitenden Muskulatur zu decken.

Der längerfristige Effekt von sportlicher Aktivität besteht aus der Initiierung von Anpassungsvorgängen, die Einfluss auf die Funktion und anatomische Struktur von mesenchymalen Gewebe, insbesondere Muskel- und Knochengewebe hat. Diese Anpassung beinhaltet zum Beispiel das Muskelwachstum und den Knochenaufbau.

Der genaue Mechanismus hinter diesen Anpassungsvorgängen ist noch nicht vollkommen bekannt. Es wird vermutet, dass dabei Zytokine und Myokine eine entscheidende Rolle spielen. Zytokine sind hormonell aktive Proteine, die nicht von klassischen Hormondrüsen, sondern vom betroffenen Gewebe selbst ausgeschüttet werden. Handelt es sich bei dem Gewebe um Muskel, nennt man diese ausgeschütteten Proteine Myokine.

1.1 Anatomische und histologische Grundlagen

Um die Anpassungsreaktionen genauer zu verstehen, ist es essentiell sich mit der Anatomie und Histologie der betroffenen Gewebearten vertraut zu machen. Im Folgenden wird auf diese Grundlagen, explizit für Muskel- und Knochengewebe, genauer eingegangen.

1.1.1 Knochengewebe

Im menschlichen Körper unterhält Knochen drei wichtige Funktionen: Zum einen die mechanische Stützfunktion, zum anderen einen Speicherort für Kalzium und drittens einen Ort zur Hämatopoese. Um diese Aufgaben zu erfüllen hat Knochengewebe eine ganz spezielle Architektur und unterliegt stetig einem Umbauprozess.

Makroskopisch lassen sich beim Knochen zwei Bauformen unterscheiden: Spongiosa und Kompakta. Spongiosa besteht aus einem Gitterwerk von dünnen Platten und Knochenbälkchen (Trabekel) und befindet sich im Inneren des Knochens. Dabei sind die Trabekel so angeordnet, dass sie Druck oder Zug aushalten können (trajektorielle Ausrichtung). Die Hohlräume dazwischen werden im menschlichen Körper durch Knochenmark ausgefüllt, das unter anderem für die Hämatopoese zuständig ist. Im Gegensatz dazu steht die Kompakta, die die homogen erscheinende Rindenschicht (Corticalis) eines Knochens ausmacht. [2]

Der Knochenumbau geschieht in einem solchen Ausmaß, dass dabei im Jahr ca. 18% des ganzen Skelettkalziums umgesetzt wird. An diesem Vorgang sind direkt im Knochen drei verschiedene Zellarten direkt beteiligt. Den Knochenaufbau übernehmen Osteoblasten (Knochenbildner). Dafür synthetisieren sie Kollagen (für neue Knochenlamellen) und regulieren die Mineralisation dieser Matrix. Werden Osteoblasten dann von anderen Osteoblasten komplett in mineralisierte Matrix eingebaut, differenziert ein Teil zu Osteozyten aus. Diese halten über Ausläufer Kontakt mit benachbarten Osteozyten. Dieses Netzwerk wirkt als hauptsächlicher Mechanosensor für physikalische Beanspruchung des Knochens und leitet den Knochenumbau ein. Dabei aktivieren Osteozyten Signalwege, die den Knochenaufbau und -abbau regulieren.

Osteoklasten sind die Gegenspieler des Knochenaufbaus. Sie sind mehrkernige Riesenzellen, deren Aufgabe die Knochenresorption ist. Dabei wird durch Säure und Enzyme die mineralische und organische Matrix aufgelöst. Dies geschieht zum einen zur Bereitstellung von Kalzium und Phosphat für den Organismus und ist zum anderen ein Teil des Knochenumbaus, dem sogenannten „bone remodelling“. [2, 3]

1.1.2 Muskelgewebe

Die Muskulatur macht etwa 50 Prozent der Körpermasse aus. Man kann sie je nach Histologie und Funktion in drei verschiedene Typen einteilen. Die größte Gruppe stellt die quergestreifte Skelettmuskulatur da. Daneben gibt es die Herzmuskulatur, die durch Eigenregung die Herzaktivität auslöst und ausführt. Zuletzt gibt es noch die Gruppe der glatten Muskulatur, die vom vegetativen Nervensystem gesteuert wird und sich je nach Vorkommen sehr heterogen in Bezug auf Aufbau und Funktion darstellt. [4]

Für diese Studie wird explizit die quergestreifte Skelettmuskulatur betrachtet. Sie ist Teil des menschlichen muskuloskelettalen Systems und spielt damit eine entscheidende Rolle bei der Fortbewegung. Diese Muskeln sind auch als einziger Muskeltyp über das somatische Nervensystem innerviert, das heißt, man kann sie willkürlich steuern. Eine weitere Funktion ist zum Beispiel die Wärmeproduktion, die wichtig für die Temperaturregulierung des Körpers ist. [4, 5]

Der menschliche Körper besitzt um die 400 Einzelmuskeln. [4] Diese bestehen aus vielen meist parallel angeordneten Muskelzellen. Eine Muskelzelle oder auch „Muskelfaser“ ist ein Synzytium mehrerer Myoblasten und damit eine vielkernige Riesenzelle, die mehrere Zentimeter Länge aufweisen kann. Sie enthält einzelne Myofibrillen, die aus Sarkomeren aufgebaut sind. Sarkomere bestehen wiederum aus Filamenten wie Aktin, Titin und Myosin und enthalten zusätzlich regulatorische Komplexe wie Troponin und Tropomyosin. Durch spezifische, sehr regelmäßige Anordnung dieser Bestandteile und deren unterschiedlicher Brecheigenschaften für Licht kommt es zu einer optischen Querstreifung dieser Zellen unter dem Lichtmikroskop. Die Myofibrillen sind von einer eiweißhaltigen Flüssigkeit, dem Sarkoplasma, umgeben, die unter anderem auch

Myoglobin enthält. Myoglobin ist der Struktur von Hämoglobin im Blut sehr ähnlich und kann ebenso Sauerstoff an sich binden. Damit ist Myoglobin der Sauerstoffspeicher einer Muskelzelle. Eine weitere wichtige Rolle in der Muskelzelle spielt das Sarkoplasmatische Retikulum. Im Muskel übernimmt es unter anderem die Aufgabe eines Speichers für Kalzium, das eine entscheidende Rolle bei der Muskelkontraktion spielt. [6]

Zur Kontraktion einer Muskelzelle muss diese durch ein motorisches Neuron an der motorischen Endplatte erregt werden. Dabei kommt es durch einen Natriumeinstrom zur Depolarisation der Zellmembran und dadurch zur Entstehung eines Aktionspotentials. Durch spannungsabhängige Kalziumkanäle kommt es zu einem massiven Kalziumeinstrom aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum in das Sarkoplasma. Die so erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration führt dann über eine Vernetzung der Filamente und eine ATP-abhängige Konformationsänderung des Myosins zu einer Verkürzung der Sarkomere und damit Kontraktion des Muskels. Endet das Aktionspotential, versiegt auch der Kalziumeinstrom in die Zelle. Durch Kalziumpumpen wird das Kalzium wieder zurück in das Sarkoplasmatische Retikulum transportiert. Damit kommt es zum Ende der Interaktion der Filamente und zur Erschlaffung des Muskels [2, 4, 6, 7]

Es gibt drei verschiedene Typen von Muskelfasern: Typ I, Typ IIa und Typ IIx. Typ I-Fasern werden auch Slow-Twitch-Fasern (ST-Fasern) genannt. Sie kontrahieren, wie der Name schon vermuten lässt, relativ langsam. Ihre Energiegewinnung findet hauptsächlich oxidativ statt. Deswegen sind ST-Fasern von vielen Kapillaren umgeben und enthalten viele Mitochondrien und viel Myoglobin, was ihnen eine rote Farbe verleiht. Als weitere Energiequelle steht diesem Fasertyp auch im hohen Ausmaß der Fettstoffwechsel zur Verfügung. Das führt dazu, dass diese Typ I-Fasern relativ ermüdungsresistent sind.

Im Gegensatz dazu steht der Fasertyp IIx (ehemals IIb), die sogenannten Fast-Twitch-Muskelfasern. Diese kontrahieren sich schnell und sind myoglobinarm. Durch ihre reduzierte Dichte an Kapillaren und Mitochondrien arbeiten sie vor allem glykolytisch und sind relativ rasch ermüdbar.

Der Fasertyp IIa ist ein Zwischentyp aus beiden Fasern. Er kontrahiert sich wie der Fasertyp IIx weiterhin schnell, hat aber einen hohen Myoglobingehalt und die Energiegewinnung erfolgt sowohl glykolytisch, als auch oxidativ. Damit liegt die Ermüdbarkeit dieses Fasertyps zwischen der von Typ I und Typ IIx. [2, 4, 7]

Dieser Geschwindigkeitsunterschied lässt sich durch unterschiedliche Isoformen der schweren Ketten von Myosin erklären. Diese besitzen eine unterschiedliche ATPase-Aktivität, die eine wichtige Rolle bei der Kontraktion spielt. Sie werden analog zu den Muskelfasertypen als MHC (Myosin Heavy Chain) I, IIa, IIx benannt.

Der Anteil dieser Muskelfasertypen variiert je nach Funktion des Muskels. So weist beispielsweise der Musculus biceps brachii als typischer Schnelligkeitsmuskel einen geringen Anteil an Slow-Twitch-Fasern auf. Im Gegensatz dazu hat beispielsweise die Wadenmuskulatur (M. gastrocnemius und M. soleus) einen hohen Anteil an ST-Fasern, weil sie sehr viel Ausdauer- und Haltearbeit verrichten muss. [6, 8]

Der Anteil an ST- und FT-Fasern ist genetisch festgelegt und ist im überwiegenden Teil der Bevölkerung ungefähr gleich groß. [9] Er kann aber durch Training aktiv verändert werden. So weisen beispielsweise Weltklassesprinter eine starke Dominanz an FT-Fasern auf, wohingegen ein Weltklassedistanzläufer einen vermehrten Anteil an ST-Fasern besitzt. [8, 10]

1.2 Adaptation mesenchymaler Gewebe

Auf den menschlichen Körper wirken durchgehend Kräfte. Allein das aufrechte Stehen benötigt ein intaktes knöchernes Skelett und ein stetiges komplexes Zusammenspiel von Muskulatur, Sehnen und Bändern, die sich der Schwerkraft entgegenstellen. Hinzu kommt die Belastung auf den Körper bei Bewegung. Es gibt unzählige unterschiedliche Arten der Bewegung und somit auch unterschiedliche Herausforderung auf unseren Körper. Wie sich das Herz-Kreislauf-System einer gesteigerten Belastung anpasst, z.B. durch Vergrößerung des Herzens und der Verbesserung der Durchblutung einzelner Organe, muss sich auch mesenchymales Gewebe, allen voran das muskuloskelettale System, neuen Beanspruchungen anpassen.

Diese Anpassungsvorgänge laufen nach ähnlichem Schema ab. Die mechanische Belastung wird registriert (Mechanosensing) und dieses Signal wird weitergeleitet (Mechanotransduktion) was schließlich zu einer Anpassung des Gewebes führt. Auf diesen Mechanismus wird in diesem Kapitel näher eingegangen.

1.2.1 Mechanosensing

Mechanosensing bezeichnet die Wahrnehmung von mechanischen Stress durch den menschlichen Körper. Dafür benötigt dieser Elemente, die eine externe Kraft oder eine Belastung registrieren können. Es gibt verschiedene Hypothesen dazu, wie genau dieser Vorgang funktioniert. Grundlage einer Hypothese ist, dass mechanosensitive Proteine, verankert an der extrazellulären Matrix oder dem Zytoskelett, direkt auf Kraft reagieren können. Diese Kraft führt zu einer Konformationsänderung der Proteine, die dann entweder direkt das Signal weiterleiten oder durch eine frei gewordene Bindungsstelle andere Proteine aktivieren können. Eine weitere Möglichkeit ist die Registrierung der Verformung der Zelle durch Proteine in der Doppelmembran. [11]

Im Knochengewebe übernehmen Osteozyten die Aufgabe des Mechanosensing. [12] Der genaue Mechanismus ist bis jetzt noch unklar. Verschiedene Theorien sprechen von Mechanosensing bei Zugkräften zwischen den einzelnen Osteozyten oder Osteozyten und der Extrazellulären Matrix. Ein weiteres Beispiel wäre die direkte Detektion von Scherkräften, hervorgerufen durch den Fluss von lakunärer Flüssigkeit. [13, 14]

Muskelgewebe kann neben der Registrierung von direktem mechanischen Stress auch anderweitig eine körperliche Belastung erkennen. Das umfasst unter anderem eine vermehrte Durchflussrate von Kalzium bei vermehrter Muskelkontraktion, insbesondere beim Krafttraining oder anderen metabolischen oder lokalen Veränderungen in der Muskelzelle. Zum Beispiel wird in der Muskelzelle zur Energiegewinnung bei Muskelkontraktion Adenosintriphosphat (ATP), der direkte Energiespeicher der Zelle, zu Adenosinmonophosphat (AMP) gespalten. Das dadurch beeinflusste AMP/ATP-Verhältnis kann durch die Zelle direkt registriert werden. Die Zelle kann auch eine trainingsinduzierte Hypoxie, den Redox-Status oder die Anwesenheit von Sauerstoffradikalen wahrnehmen. [15]

1.2.2 Mechanotransduktion

Unter Mechanotransduktion versteht man die Umwandlung von mechanischen Reizen in biochemische oder elektrische Reize. Wurde mechanischer Stress registriert (Mechanosensing), löst das eine Signalkaskade aus, die unter anderem zur Anpassung des Gewebes an die veränderte Belastungssituation führt. Daran sind unterschiedlichste molekulare Signalwege beteiligt, die dann beispielsweise zu einer erhöhten oder erniedrigten Expression von Genen und somit zu einer gesteigerten oder reduzierten Synthese von Proteinen führen können. Die genauen Signalwege sind allerdings bisher noch nicht abschließend erforscht. Auf diese soll in dieser Arbeit auch nicht genauer eingegangen werden.[16]

1.2.3 Adaptationsvorgänge im Knochengewebe

Bereits am Ende des 19. Jahrhunderts konnte der Berliner Anatom und Chirurg Julius Wolff mit seinem Werk „*Das Gesetz der Transformation der Knochen*“ zeigen, dass es zu Anpassungsvorgängen im Knochen auf mechanische Belastung kommt. Er beschrieb schon damals, dass im mechanisch beanspruchten Knochen Knochensubstanz aufgebaut wird und dementsprechend die Knochendichte und Festigkeit des Knochens zunimmt. Er konnte damals auch schon am Beispiel von Femurköpfen eine Ausrichtung der Knochen trabekel auf die auf sie wirkende Kraft nachweisen. [17]

Diese damals schon entdeckte Anpassungsfähigkeit des Knochens fußt auf seiner Fähigkeit des Knochenumbaus, dem sogenannten „bone remodelling“. Dieser kontinuierliche Prozess wirkt dabei nicht nur der Materialermüdung oder Mikroschäden in der Knochensubstanz entgegen, sondern führt auch zur Beeinflussung der Knochendichte und -struktur. Dies ist möglich durch eine Regulation des Knochenaufbaus und Knochenabbaus.

Stark belasteter Knochen hat eine positive Bilanz, das heißt es wird mehr Knochen auf- als abgebaut. Dies beruht auf einer gesteigerten Aktivität der Osteoblasten und einer gehemmten Osteoklastenaktivität. Zusätzlich dazu verändert sich die Trabekelstruktur in der Spongiosa. Im kaum belasteten Knochen kommt es zu einer gegensätzlichen Reaktion. Bei negativer Bilanz wird insgesamt Knochensubstanz abgebaut, was zu einer Reduktion der Knochendichte und Festigkeit führt und den Knochen anfälliger für Verletzungen macht. [2]

Neben regelmäßigem Training hat auch das Alter eine entscheidende Rolle bei der Knochenbilanz. Generell überwiegt im menschlichen Skelett bis zum 4. Lebensjahrzent der Knochenaufbau. Danach verändert sich aber die Skelettbilanz ins Negative. Die Knochenresorption überwiegt, sodass die Knochendichte immer weiter sinkt. Dies ist aber zu einem gewissen Maß rein physiologisch und wird dementsprechend als physiologische Altersknochenatrophie, bzw. Altersosteopenie bezeichnet. Übersteigt dieser Knochenabbau aber dieses physiologische Maß spricht man vom pathologische Knochenschwund, der Osteoporose. [18]

An diesem Vorgang könnte auch der Verlust der Anpassungsfähigkeit an mechanische Belastung beteiligt sein. Es gibt Hinweise darauf, dass es im Laufe des Lebens zu einer Formveränderung der Osteozyten kommt, die deren Fähigkeit zum Mechanosensing einschränkt. [19]

1.2.4 Adaptationsvorgänge im Muskelgewebe

Muskelgewebe reagiert sehr unterschiedlich auf unterschiedliche Arten von Belastung. Krafttraining führt zu einem Kraftgewinn durch Verbesserung der neuromuskulären

Koordination und Vergrößerung des Muskelquerschnitts. Im Gegensatz dazu steht Schnelligkeitstraining, dessen Trainingseffekt auf eine Erhöhung des Anteils an schnellen FT-Muskelfasern abzielt. Ausdauertraining beeinflusst ebenfalls den Muskelfasertyp, allerdings in Richtung der langsamen, ausdauernden ST-Fasern. Außerdem wird bei Ausdauertraining auch die respiratorische und kardiovaskuläre Kapazität beeinflusst. [4]

Zu einer Größenzunahme der Muskulatur kommt es entweder durch Vergrößerung der bestehenden Muskelfasern (Hypertrophie) oder durch Neubildung von Myozyten aus Satellitenzellen. Satellitenzellen sind die „Hausstammzellen“ des Muskels und werden aktiv bei Krafttraining und Verletzungen. Sie können sich selbst erneuern und zu neuen Muskelfasern ausdifferenzieren oder mit alten Myozyten fusionieren. Auch wenn nachgewiesen wurde, dass auch Stammzellen aus dem Knochenmark in der Lage sind, Muskelgewebe zu regenerieren [20], spielen Satellitenzellen immer noch die übergeordnete Rolle bei den Anpassungsvorgängen im Muskel. [15] Eine zweite Population mesenchymaler Vorläufer wirkt supportiv für die Regeneration durch Satellitenzellen.

Das Verhältnis zwischen FT- und ST-Fasern wird durch die unterschiedliche Expression der schweren Myosinkettentypen (MHC-Typen) beeinflusst. Bei Krafttraining kommt es dabei zur Zunahme der MHC IIa. Bei Ausdauertraining wird MHC I stärker exprimiert. [21] Allerdings kommt es im Allgemeinen nicht zu einer Umwandlung von FT- zu ST-Fasern, da dies mit einer Umwandlung der schweren Myoglobinketten einhergehen würde. Es kann aber zu einer Umwandlung innerhalb des Typ-II-Faserspektrums kommen. [9]

Diese Anpassungsfähigkeit, sei es mittels Beeinflussung der Fasertypen oder Vergrößerung des Muskelquerschnitts, wird auch Muskelplastizität genannt. Muskelplastizität beschreibt aber nicht nur die positiven Effekte von regelmäßigem Training. Körperliche Inaktivität führt zu einem Abbau an Muskelmasse und der Rückentwicklung des Muskelfasertyps. [21]

Analog zur Knochensubstanz führt nicht nur körperliche Inaktivität zu einer Reduktion der Muskelmasse. Laut einigen Studien beginnt schon um das 30. Lebensjahr ein

altersbedingter Muskelverlust, der häufig von einem Verlust der Muskelkraft (Dynapenie) begleitet wird. Übersteigt dieser Verlust ein gewisses Maß, spricht man von Sarkopenie. Diesem Vorgang liegen unterschiedliche Faktoren zu Grunde. Neben dem Verlust mechanischer Reize spielt eine Dysbalance zwischen Proteinsynthese und -abbau, auf Grund von erhöhter Wirkung von katabol wirkenden Hormonen, aber auch eine Mangel-, bzw. Überernährung und reduzierte körperliche Aktivität eine Rolle. Ebenfalls denkbar wäre, analog zum Knochen ein verringertes Mechanosensing, bzw. eine geringer ausgeprägte Anpassungsreaktion auf körperliches Training.

1.3 Biomarker im Serum als Reaktion auf physikalische Reize – körperliches Training

Eine akute körperliche Belastung bedeutet in erster Linie Stress für den Körper. Er muss sich dem gesteigerten Energie- und Sauerstoffbedarf anpassen. Die Herz- und Atemfrequenz werden gesteigert und der Blutdruck steigt. Längeres körperliches Training erfordert eine Mobilisation von Energiereserven aus Leber und Fettgewebe und der Regulation des Elektrolyt- und Flüssigkeitshaushalts. Dieser Vorgang wird von einer komplexen Interaktion zwischen nervalem und hormonellen System gesteuert.

Solche physikalischen Reize sorgen außerdem dafür, dass sich das betroffene Gewebe auch längerfristig an so eine Belastungssituation anpasst. Dies betrifft unter anderem auch das muskuloskeletale System. Muskel und Knochen sind mit ihren mechanoresponsiven Elementen in der Lage, direkt diesen physikalischen Reiz wahrzunehmen und Signalwege zu aktivieren, die zu einer strukturellen Anpassung führen. Darunter fällt die Ausschüttung von Zytokinen und Myokinen. Beim Knochen übernehmen diese Aufgabe Osteozyten, beim Muskel unter anderem Myozyten. Allerdings laufen die Reaktionen von Knochen- und Muskelgewebe nicht vollkommen getrennt voneinander ab. Es existiert eine ausgeprägte Interaktion zwischen den beiden Gewebeformen. Abgesehen von der direkten Krafteinwirkung in Form von Muskelkontraktionen auf den Knochen, gibt es auch die direkte Kommunikation mittels Zyto- und Myokinen. Einige dieser sezernierten Proteine führen bei beiden Gewebeformen zu Anpassungsreaktionen. [2]

Es existiert eine Vielzahl von Zytokinen und Myokinen, die Einfluss auf das Muskel- und Knochengewebe nehmen. Unsere Auswahl beschränkt sich in dieser Arbeit allerdings auf Myostatin (MSTN), Follistatin (FST), Follistatin-like-3 (FSTL3), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8) und Klotho. Bei der Erstellung des Studienaufbaus stellten sich diese Biomarker als sehr vielversprechend dar, um ein breites Spektrum von Anpassungsreaktionen auf körperliches Training nachzuweisen. Es existierten für diese zu diesem Zeitpunkt schon einige Studien, die auf so eine Reaktion hinwiesen (siehe *Tabelle 1*).

Tabelle 1 Bisherige Studien zur Zytokin/Myokin-Ausschüttung nach körperlichem Training

Trainingsart	Dauer	Probenart Abnahmezeitpunkt	Effekt	Quelle
Beinpresse +Beinstrecker	40min	Muskelbiopsie Prä, post (12, 24, 48, 72h)	MSTN mRNA \downarrow	[22]
Fahrradergometer	3h	Blut Prä, intra (1, 2h), post(0, 3, 6h)	FST \nearrow	[23]
Fahrradergometer	2h	Blut Prä, intra(1, 2h), post (1, 2, 3, 4, 5h)	FST \nearrow	[24]
Laufbandergometer	~45min	Blut Prä, post	FST \nearrow FSTL3 \nearrow	[25]
Beinstrecker oder Laufbandergometer	30min	Muskelbiopsie Prä, post (0, 1, 2, 4, 8, 12, 24h)	MSTN mRNA \downarrow IL-6 mRNA \nearrow IL-8 mRNA \nearrow	[26]
Fahrradergometer (Warm-up + maximal)	12+8 min	Serum Prä, Post (0, 1h)	IL-6 \nearrow ; IL-8 \nearrow	[27]
Laufbandergometer (16% Steigung)	60min	Blut Prä, post (0, 24h)	IL-6 \nearrow	[28]
Fahrradergometer + Elektrostimulation	30min	Blut Prä, post (0, 15, 30, 60min)	IL-6 \nearrow	[29]
Handkurbelgerät (+Fahrradergometer)	30min	Blut Prä, post (0, 60, 120min)	IL-6 \nearrow	[30]
Laufbandergometer (vor und nach 12-16 Wochen intensiven Trainings)	60min	Blut Prä, post	KL \leftrightarrow (untrainiert) Klotho \nearrow (trainiert)	[31]
Laufbandergometer	20min	Serum Prä, post	KL \leftrightarrow (bei σ) KL \nearrow (bei ♀)	[32]

1.3.1 Myostatin/ Follistatin/ Follistatin-like-3

Myostatin

Myostatin oder ursprünglich „Growth and Differentiation Factor-8“ (GDF-8) genannt, gehört zu der TGF- β -Familie und wirkt inhibierend auf das Muskelwachstum. Die TGF- β -Familie besteht aus verschiedensten multifunktionellen signalübertragenden Proteinen, die unter anderem auch an der Myogenese regulatorisch beteiligt sind. Es kommt sowohl im Menschen als auch im Tier vor. Ganz eindrücklich sieht man den wachstumshemmenden Einfluss auf die Muskulatur bei der Rinderrasse „Belgian Blue Cattle“. Bei dieser Art kommt es durch eine natürliche Mutation des Myostatin-Gens zu dessen Funktionsausfall und damit zu verstärktem Muskelwachstum und einer markant vergrößerten Muskelmasse (siehe *Abbildung 1*). [33, 34] Dasselbe Phänomen konnte in zahlreichen Mausmodellen mit MSTN $-/-$ -Knockout-Mäusen [35] und auch bei Menschen mit einer entsprechenden Mutation [36] beobachtet werden.



Abbildung 1 Belgian Blue Cattle: Auffällig muskulöser Körperbau, hervorgerufen durch eine Mutation im MSTN-Gen [37]

Lizenzierte Abbildung (CC BY-SA 3.0) von Stoolhog: „Koe van Belgisch blauwe ras.“

Die Wirkungsweise von Myostatin geht unter anderem auf der Hemmung des Akt/mTOR-Signalwegs zurück, der eine wichtige Rolle bei der Proteinsynthese spielt. Durch diese Hemmung der Proteinsynthese kommt es dann mittelfristig zum Muskelabbau. [38]

Eine weitere benutzte Signalkaskade läuft über den SMAD-Signalweg, eine Endstrecke der Signaltransduktion durch Mitglieder der TGF- β -Familie. Myostatin bewirkt dann schlussendlich eine veränderte Expression bestimmter Zielgene, die dann im weiteren Verlauf zu einer Reduzierung der Myoblastenproliferation und -fusion führt.

Die Konzentration von Myostatin hängt dabei von vielen Faktoren ab. Nach körperlichem Training, sei es Kraft- oder Ausdauersport, konnte man eine Reduktion des Myostatinpiegels beobachten. [26, 39] Kommt es aber zu einer Muskelverletzung, kommt es zu einer starken Expression von Myostatin im nekrotischen Muskel. [40] Dies könnte dafür sprechen, dass Myostatin als eine Art Inhibitor für Satellitenproliferation in der ersten Reparationsphase fungiert. [34]

Es gibt auch Hinweise darauf, dass Myostatin seine Wirkung nicht nur auf Muskelgewebe ausübt, sondern auch auf Knochen. Eine Studie konnte eine erhöhte Knochendichte des Femurs und der Lendenwirbelsäule bei MSTN $-/-$ Knockout Mäusen beobachten. Ob dieser Effekt aber aktiv durch Myostatin hervorgerufen wird oder nur ein Resultat der Muskelmassenveränderung ist konnte nicht abschließend geklärt werden. [41-43]

Follistatin

Follistatin ist ein autokrin, parakrin und hormonell wirksames Protein, das 1987 in Eierstockfollikeln entdeckt und später auch im Blut nachgewiesen werden konnte. Seinen Namen verdankt Follistatin seiner Eigenschaft, das follikelstimulierende Hormon (FSH) zu binden. [44] Der Hauptursprungsort von im Blut zirkulierendem Follistatin soll die Leber sein. Eine Ausschüttung wird unter anderem vom Glukagon-Insulin-Verhältnis reguliert. [45] Eine wichtige Funktion ist, dass Follistatin verschiedene Mitglieder der TGF- β -Familie mit hoher Affinität binden und somit neutralisieren kann (löslicher Decoy-Rezeptor). [46] Darunter fällt auch Myostatin, das eine sehr ausgeprägte Hemmfunktion für Muskelwachstum aufweist (siehe oben). Tatsächlich konnte bei Mäusen, die eine Überexpression für Follistatin aufwiesen, eine deutliche Erhöhung der Muskelmasse nachgewiesen werden, ähnlich der bei Myostatin-Knockout-Mäusen. [47, 48]

Dass Follistatin auch Einfluss auf die Reaktion von Muskelgewebe auf körperliches Training hat, konnte durch verschiedene Studien herausgefunden werden. Diese zeigten zum Teil eine deutliche Erhöhung des Follistatin-Levels im Blut nach einer Trainingseinheit. [23, 24] Interessanterweise konnte aber kein Anstieg der Follistatin-Konzentration im Muskelgewebe nachgewiesen werden, was nahelegt, dass Follistatin, zumindest während des Trainings, nicht vom Muskel synthetisiert wird. [23, 25]

Follistatin-like-3

Follistatin-like-3 (oder auch FLRG) ist, wie der Name schon sagt, ein Protein, das eng verwandt mit Follistatin ist. FSTL3 wird laut Gene-Database von einer Vielzahl von Zellen gebildet (u.a. Placenta, Hoden, Herz und Lunge). [49] Außerdem ist es eng verknüpft mit endotheliale Gewebe. [50] Es hat ebenso die Fähigkeit, Mitglieder der TNF- β -Familie an sich zu binden und diese zu inaktivieren. Es führt parallel zu Follistatin bei Überexpression zu einem gesteigerten Muskelwachstum. [51, 52]

Neben dem Einfluss auf Muskelgewebe zeigt FSTL3 auch einen positiven Einfluss auf die Knochengesundheit, bzw. die Regeneration von Knochen. [53] Bei Fstl3-Knockout-Mäusen konnte eine deutlich reduzierte Knochenstärke festgestellt werden. Außerdem konnte eine Korrelation zwischen FSTL3 und der Knochendichte nachgewiesen werden. [54]

Es ist allgemein bekannt, dass körperliche Betätigung für die Knochengesundheit eine entscheidende Rolle spielt. Bei FSTL3 könnte es sich um einen Mediator für Anpassungsreaktionen handeln, nachdem herausgefunden wurde, dass die Expression an FSTL3 im Knochen deutlich nach einem körperlichen Training angestiegen ist. [54]

1.3.2 Interleukin 6 und Interleukin 8

Interleukine wurden ursprünglich dem Immunsystem zugeordnet und ermöglichen dort die Steuerung der Immunreaktion und die Kommunikation zwischen verschiedenen Immunzellen. Zur heutigen Zeit weiß man aber, dass Interleukine auch von anderen

Zellen synthetisiert werden, unter anderem von Endothelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten. Werden sie von Muskelgewebe gebildet, nennt man sie Myokine, bei Fettgewebe Adipokine.

Interleukine weisen unterschiedliche Funktionen auf. So gibt es proinflammatorische Interleukine, die zu einer Aktivierung des Immunsystems führen, und antiinflammatorisch wirkende Interleukine, die dem entgegenwirken. Zu den proinflammatorischen Zytokinen gehört unter anderem Interleukin 6. IL-6 stimuliert sowohl T- und B-Lymphozyten, löst Fieber aus und fördert die Synthese von Akute-Phase-Proteinen in der Leber. [55] Es können erhöhte Werte im Blut bei verschiedenen Entzündungen nachgewiesen werden. IL-6 kann in der Klinik als Verlaufsparemeter für eine Entzündung herangezogen werden, wird heute aber nur noch selten bestimmt.

Dabei wirkt IL-6 nicht nur in Verbindung mit einer Infektion. Studien haben herausgefunden, dass sich IL-6 auch in Verbindung mit körperlichem Training erhöht. Dieser Anstieg ist zurückzuführen auf eine erhöhte kurzfristige Freisetzung und mittelfristige Steigerung der Synthese von IL-6 im Muskelgewebe. Dieses wird dort wohl als Reaktion auf körperliche Belastung vor allem während, aber auch kurz nach dem Training gebildet. [56] Dabei ist die Konzentration von IL-6 von der Länge und Intensität der Belastung und der benutzen Muskelmasse abhängig. IL-6 kann dabei auch als Signal eines Energiedefizits gebildet werden und dann in der Leber zur Gluconeogenese anregen. [57, 58]

Eine dauerhafte Erhöhung von IL-6 im Rahmen einer chronischen Entzündung kann allerdings negative Auswirkungen auf Knochen- und Muskelgesundheit haben. Dabei sorgen aktivierte katabole Vorgänge eher zu einem Abbau von Muskel- und Knochengewebe.

Interleukin 8 zählt zu den Chemokinen und hat damit eher eine lokale Wirkung, indem es Leukozyten mittels Induktion von Chemokinese, Chemotaxis und Diapedese in Entzündungsherde umverteilt. [4]

In Muskelzellen kommt es nach Aktivität ähnlich wie bei IL-6 zu einem Anstieg der Synthese von IL-8. Allerdings ist dieser im Gegensatz zu IL-6 häufig nicht so ausgeprägt

und nur bei intensivem exzentrischen Muskeltraining im Blut nachweisbar. Es wird vermutet, dass IL-8 eine Rolle bei der Angiogenese spielt. [58]

1.3.3 Klotho

Klotho wird auch das „Jugendlichkeitshormon“ genannt, nachdem bei Mäusen mit einer Mindereexpression von Klotho eine beschleunigte Alterung festgestellt wurde. [59] Das zeigte sich unter anderem in einer beschleunigten Entwicklung von Arteriosklerose, Sarkopenie und Osteoporose. [60] Im Umkehrschluss konnte man zeigen, dass Mäuse, bei denen eine Überexpression des Gens vorlag, länger lebten. [61] Der Name kommt aus der griechischen Mythologie, in der Klotho als Lebensfaden-spinnende Schicksalsgöttin vorkommt. Klotho wird hauptsächlich vom Nierengewebe gebildet. Kommt es zu einer Erkrankung der Niere wie z.B. der chronischen Niereninsuffizienz sinkt der Spiegel von Klotho im Blut. [60] Klotho wirkt dort unter anderem als ein Ko-Faktor für den Fibroblast Growth Factor (FGF) 23 und ist damit an der Regulation der Ausscheidung von Phosphat und der Synthese von Vitamin D in der Niere beteiligt. Klotho ist im engeren Sinne ein membranständiger Ko-Rezeptor für FGF-Rezeptoren. Durch proteolytisches Shedding der extrazellulären Protein-Strukturen kann es aber auch in die Zirkulation gelangen und so eine Art „endokrine“ Wirkung an anderen Geweben vermitteln [62]

Dass körperliches Training zu einem gesünderen und damit längeren Leben führt, ist allgemein bekannt. Dass Klotho dabei eine Rolle spielt, ist zu vermuten nachdem herausgefunden wurde, dass dessen Plasmaspiegel nach einem körperlichen Training ansteigt [32]. Im Alter oder bei schlechter Fitness der Probanden fällt der Klothospiegel jedoch geringer aus. [63, 64]

1.3.4 Steroidhormone

Steroidhormone sind Hormone, die ein von Cholesterin abgeleitetes Steroid-Grundgerüst als Grundstruktur besitzen. Zu dieser Gruppe gehören unter anderen Mineralokortikoide, Glukokortikoide und Sexualhormone. Mineralokortikoide,

Glukokortikoide und ein Teil der Sexualhormone werden in der Nebennierenrinde synthetisiert.

Abbildung 2 gibt einen Überblick über die Synthesestufen von Steroidhormonen. Jeder Schritt der Synthese ist abhängig von einem Enzym. Kommt es, z.B. durch eine genetische Mutation, zu einer Störung dieser Enzyme, kann dies die ganze Steroidhormonproduktion beeinflussen.

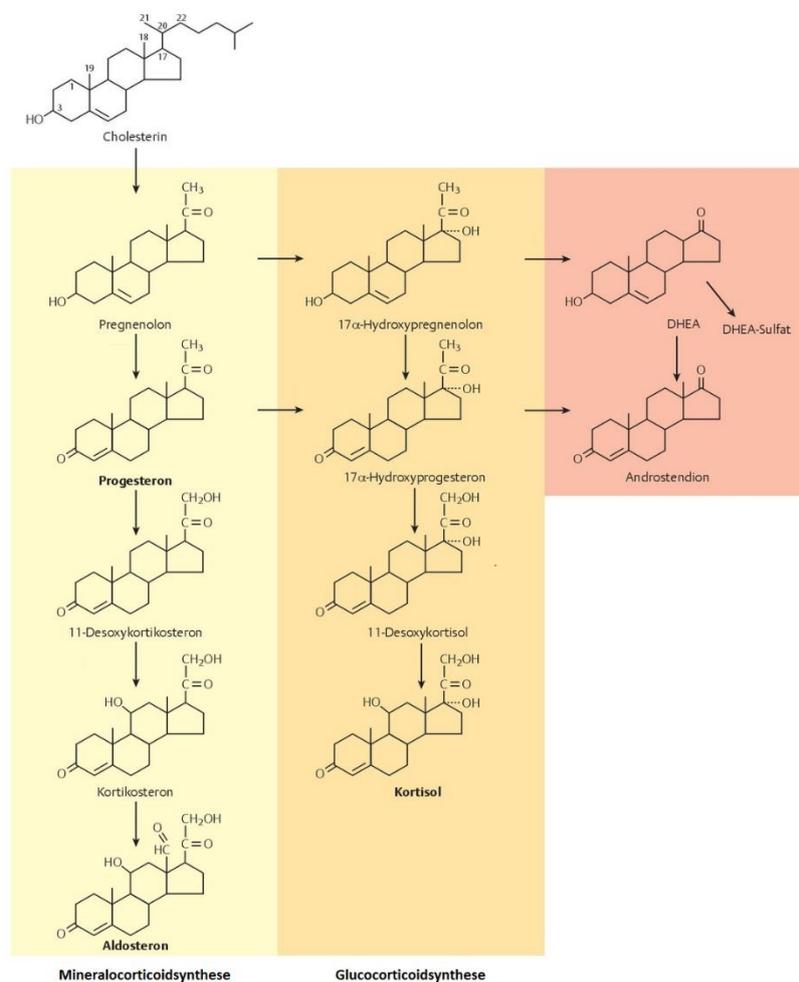


Abbildung 2 Steroidhormon-Biosynthese in der Nebennierenrinde (modifiziert nach [65])

Angepasst mit Erlaubnis von Thieme: Georg Thieme Verlag; Duale Reihe Physiologie; Hormone der Nebennierenrinde; Deutzmann, R.; 2016

Mineralokortikoide haben eine große Wirkung auf den Salz- und Wasserhaushalt des Körpers und damit auch auf den Blutdruck. Der wichtigste Vertreter der Mineralokortikoide ist Aldosteron. Dessen Synthese wird durch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) reguliert. Das RAAS ist vor allem bei Hypovolämie aktiv und führt dabei zu einer Ausschüttung von Aldosteron, was eine gesteigerte Volumenrückresorption in der Niere zur Folge hat. Aldosteron bewirkt in der Niere eine gesteigerte Natriumrückresorption bei gleichzeitiger Kaliumsekretion. Deshalb stellt eine Hyperkaliämie einen weiteren Stimulus zur Aldosteronsekretion dar. Während und kurz nach einer sportlichen Aktivität kommt es zu einem Anstieg der Aldosteron-Spiegel im Blut. [66]

Glukokortikoide sind die sogenannten Stresshormone des Körpers. Sie werden in bestimmten Belastungssituationen ausgeschüttet um den Körper an die veränderte Beanspruchung anzupassen. Diese Ausschüttung wird durch die Hypothalamus-Hypophysen-Achse durch Ausschüttung von ACTH reguliert. Ihren Namen verdanken Glukokortikoide ihrer Wirkung auf den Blutzuckerspiegel. Sie sorgen für eine ausreichende Glukoseversorgung und mobilisieren Energiespeicher. Der wichtigste Vertreter der Glukokortikoide ist Kortisol. Kortisol stimuliert unter anderem katabole Vorgänge wie die Glykogenolyse in der Leber oder den Abbau von Muskelproteinen. Eine Hemmung der Proteinsynthese und der Aufnahme von Zucker in die Muskelzelle sind weitere Wirkungen von Kortisol. Glukokortikoide unterstützen außerdem die blutdrucksteigernde Wirkung von Katecholaminen und haben immunsupprimierende Eigenschaften. [67, 68]

1.4 Zielsetzung

Körperliches Training führt zu einer Anpassungsreaktion von mesenchymalen Gewebe. Wie diese Reaktion genau abläuft, ist aber noch nicht abschließend geklärt. Auf zellulärer und biochemischer Ebene spielen wohl Zyto- und Myokine eine Rolle. Das sind hormonell aktive Proteine, die direkt vom Muskel (Myokine), aber auch von anderen Zellen ausgeschüttet werden und eine lokale und systemische Wirkung entfalten.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich genau mit dieser Ausschüttung dieser Substanzen als Reaktion auf ein kurzes körperliches Training. Dafür wurde der Spiegel von Myostatin, Follistatin, Follistatin-like-3, Interleukin 6, Interleukin 8 und Klotho im Blut vor, 15 Minuten nach und 120 Minuten nach einer viertelstündigen Belastung auf einem Fahrradergometer bestimmt.

Insbesondere wurde untersucht, ob und in welchem Ausmaß es zu einer Konzentrationsänderung der oben genannten Zytokine im Serum kommt. Außerdem wurden die Daten auf Korrelationen zwischen diesen Werten und anthropomorphen Gesichtspunkten, dem körperlichen Trainingszustand und Werten aus der Bioimpedanzanalyse untersucht.

Um eine körperliche Reaktion auf diese Belastung nachzuweisen, wurde neben den genannten Zyto- und Myokinen auch Steroidhormone und die Konzentration der Synthesestufen bestimmt. Explizit wurde auf Kortisol als Vertreter der Glukokortikoide und auf Aldosteron als klassischen Vertreter der Mineralokortikoide eingegangen.

Diese Studie befasst sich nur mit männlichen Probanden im Alter zwischen 18 und 36 Jahren. Sie soll als Ausgangspunkt für weitere Studien dienen, die Unterschiede der Anpassungsreaktionen von unterschiedlichen Bevölkerungsgruppen aufdecken sollen. Geplant sind unter anderem weitere Versuche mit Hochleistungssportlern oder Menschen die unter Sarkopenie im Alter leiden. Die Hoffnung liegt darin, dass diese und zukünftige Studien einen Biomarker oder klinischen Test etablieren können, der die individuelle Fähigkeit der Antwort auf körperliche Belastung und die Wahrscheinlichkeit

des Auftretens von Alterskrankheiten und Adaptationsstörungen wie Osteoporose oder Sarkopenie vorhersagen kann.

2 Material und Methoden

Die Durchführung der Studie gliederte sich in zwei Abschnitte. Der erste Abschnitt befasst sich mit der tatsächlichen Durchführung der klinischen Studie in den Räumlichkeiten von *Predia – Sport & Gesundheitszentrum, Würzburg*. Dazu gehörte die Erhebung der Daten aus dem Fragebogen, der Vitalparameter, die Durchführung einer Bioimpedanzanalyse und im Anschluss die Durchführung des Ergometertests mit anschließender Ruhephase. Hinzu kam die Gewinnung der Blutproben zu unterschiedlichen Zeitpunkten, die, nach Abschluss des Tests, in das *Orthopädische Zentrum für Muskuloskelettale Forschung, Würzburg (OZMF)* verbracht und zur weiteren Analyse vorbereitet wurden.

Der zweite Abschnitt befasste sich mit der Analyse der Blutproben im Labor des Orthopädisches Zentrum für *Muskuloskelettale Forschung, Würzburg*, bzw. bei externen Laboren.

2.1 Probanden

Für die Studie wurden 33 körperlich gesunde männliche Probanden im Alter von 18 bis 36 Jahren ausgewählt. Voraussetzung für die Teilnahme war ein striktes Konsumverbot für Alkohol in den letzten 24 Stunden. Zusätzlich dazu durften die Probanden in diesem Zeitraum keinen Sport betreiben. Eine weitere Voraussetzung war, dass die Probanden zwei Stunden vor dem Test weder Nahrung noch Getränke, abgesehen von Wasser, zu sich genommen hatten. Alle Probanden wurden nach der medizinischen Krankengeschichte befragt, körperlich untersucht und nach Prüfung der Ausschlusskriterien (siehe *Anhang 2 Ausschlusskriterien*) für die Teilnahme an dem Versuch freigegeben. Von allen Probanden lag eine Einwilligungserklärung vor.

2.2 Durchführung der klinischen Studie

Bei der klinischen Studie „Early Adaptive Responses After Physical Training (AdAPT)“ ging es um Anpassungsreaktionen des Körpers auf sportliche Betätigung. Dabei lag der Fokus auf den sogenannten Zyto- oder Myokinen, die direkt vom Muskel, aber auch anderen Gewebearten ausgeschüttet werden und durch verschiedene Mechanismen zu Anpassungsreaktionen führen können. Die Studie beinhaltete zu diesem Zweck einen Fahrradergometertest und insgesamt drei Blutentnahmen, eine vor und zwei nach der körperlichen Belastung. Zur weiteren Datenerhebung wurde ein Fragebogen erstellt, der unter anderem auf den Gesundheits- und Trainingszustand der Probanden eingeht. Außerdem wurde noch eine Bioimpedanzanalyse zur Bestimmung der Körperzusammensetzung durchgeführt. Während des Ergometertests wurden die Vitalparameter, auch mittels EKG, überwacht und der Glukose- und Lactat-Spiegel gemessen. Für die Durchführung der Studie lag ein positives Ethikvotum vor (AZ-5/16).

2.2.1 Fragebogen

Die Probanden mussten vor dem Beginn des Ergometertests einen Fragebogen ausfüllen. Der Fragebogen beinhaltete das Alter, den Beruf, besondere Essgewohnheiten, Lebensmittelunverträglichkeiten, Tabak- und Alkoholkonsum und Fragen nach der Krankengeschichte des Probanden. Außerdem wurde der Trainingszustand durch Fragen nach der sportlichen Aktivität der jeweiligen Probanden abgefragt. Die Fragen dazu wurden aus dem *Global Physical Activity Questionnaire* in modifizierter Variante übernommen.

Global Physical Activity Questionnaire (GPAQ)

Der GPAQ ist ein Tool zum Erfassen der sportlichen Aktivität eines Menschen in seiner ganzen Lebensweise. Er beinhaltet also nicht nur den Freizeitsport, sondern auch die Aktivität bei seiner Arbeit oder bei der Fortbewegung von Ort zu Ort. Der Fragebogen bezieht sich dabei auf eine gewöhnliche Woche in den

letzten drei Monaten. In ihm wird die Belastung in zwei Kategorien eingeteilt: moderate und intensive körperliche Aktivität. [69]

Zur Auswertung wird das Metabolische Äquivalent (metabolic equivalent, MET) herangezogen. MET ist ein Maß für die relative Stoffwechselaktivität eines Menschen bezogen auf die Stoffwechselaktivität in Ruhe. Ein MET ist definiert als der Energiebedarf für ruhiges Sitzen. Dies entspricht einem Kalorienverbrauch von 1 kcal/kg Körpergewicht/Stunde. Moderates Training verbraucht im Gegensatz dazu viermal so viel Energie und hat einen Wert von 4 METs. Bei intensivem Training verdoppelt sich der Energiebedarf noch einmal, sodass dieses mit einem Wert von 8 MET definiert ist. Zur Unterscheidung zwischen moderaten und intensiven Training wurde die subjektive Empfindung des Probanden im Hinblick auf Herz- und Atemfrequenz herangezogen. [70]

Für die vorliegende Studie wurde nur der Freizeitsportbereich betrachtet und die, für die Auswertung sinnvolle Einteilung der Aktivität in Metabolische Äquivalente (MET) übernommen. Dadurch wurde der Trainingszustand der verschiedenen Probanden einheitlich quantifizierbar und einfacher vergleichbar. Die Probanden wurden nach Ihrem Sportverhalten in der Freizeit befragt. Die Probanden sollten die Fragen anhand einer typischen Woche in den letzten zwei Monaten beantworten. Sie wurden gefragt, welche Sportart, bzw. Sportarten sie in dieser Woche ausführen, wie häufig dies vorkommt und wie viel Zeit Sie damit verbringen. Sie mussten außerdem auswählen, ob sie die Intensität dieser Sportart als moderat oder intensiv einschätzen würden.

Aus diesen Daten konnte dann der Energieverbrauch im Freizeitsportbereich des Probanden errechnet werden. Das Ergebnis wurde in MET-Minuten, bzw. MET-Stunden angegeben. Dazu wurden die MET-Minuten einer einzelnen Sportart berechnet, indem man die Dauer dieser Sportart in Minuten mit vier bei moderaten Training, bzw. mit acht bei intensiven Training multipliziert hat. Die Summe der einzelnen MET-Minuten je Sportart ergab dann den Energieverbrauch des Probanden. Zur Berechnung wurde folgende Formel angewandt:

$$\sum_{k=1}^n \text{Dauer_Sportart}_k[\text{min}] * a$$

n = Anzahl der Sportarten;
 a = 4 bei moderaten Training
 a = 8 bei intensiven Training

2.2.2 Erhebung der Basisparameter

Zu den Basisparametern gehörten das Gewicht, die Körpergröße, die Herzfrequenz, der Blutdruck, der Lactat- und Blutzuckerspiegel, ein 12-Kanal-EKG und die periphere Sauerstoffsättigung. Außerdem wurde dem Probanden zu diesem Zeitpunkt Blut abgenommen um die Basalwerte der Biomarker zu erhalten.

Das Körpergewicht wurde bei den Probanden in leichter Sportbekleidung und ohne Schuhe auf einer Personenwaage der Firma *seca gmbh & co. kg.* erhoben. Die Messung erfolgte auf 0,1 kg genau. Die Körpergröße wurde an einer an der Wand angebrachten Skala auf 1 cm genau abgelesen.

Der Blutdruck wurde manuell mittels Blutdruckmanschette und Stethoskop nach Riva-Rocci erhoben. Herzfrequenz und Sauerstoffsättigung wurden an einem mobilen Pulsoxymeter abgelesen. Die Erhebung der Vitalparameter inklusive des EKGs wurde nach einer fünf minütigen Ruhezeit im Liegen vorgenommen.

Aus dem systolischen (RR_{SYS}) und dem diastolischen (RR_{DIA}) Blutdruck wurde zur besseren Vergleichbarkeit der mittlere arterielle Druck (MAD) errechnet. Dazu wurde folgende Formel verwendet: [71]

$$MAD = \frac{2 * RR(DIA) + RR(SYS)}{3}$$

Aus der Körpergröße und dem Gewicht wurde der Body Mass Index (BMI) berechnet. Dieser ist definiert als das Gewicht in Kilogramm geteilt durch die quadrierte Körpergröße in Metern (kg/m^2).

$$BMI = \frac{\text{Körpergewicht [kg]}}{(\text{Körpergröße [m]})^2}$$

Durch diesen Index wurden die Probanden in Gewichtsklassen eingeteilt. Siehe *Tabelle 2* [72]

Tabelle 2 Gewichtsklassifikation bei Erwachsenen (nach WHO, 2000) [72]

Gewichtsklasse	BMI [kg/m²]
Untergewicht	< 18,5
Normalgewicht	18,5 – 24,9
Präadipositas	25 – 29,9
Adipositas Grad I	30 – 34,9
Adipositas Grad II	35 – 39,9
Adipositas Grad III	> 40

2.2.3 Bioimpedanzanalyse

Die Bioimpedanzanalyse (BIA) wurde mit dem Gerät AKERN BIA 101 der Firma *Akern SRL, Pontassieve, Florenz, Italien* durchgeführt. Zur Vorbereitung musste der Proband den rechten Fuß freimachen und sich auf eine Liege legen. Dabei durften die Arme keinen Kontakt mit dem Körperstamm haben und die Beine sich nicht gegenseitig berühren. Die Haut wurde mit einem Desinfektionsspray an der dorsalen Seite der rechten Hand und des rechten Fußes gesäubert. Anschließend wurden jeweils zwei Elektroden an Hand und Fuß angebracht. Dann wurden die Elektroden über ein Messkabel mit dem Messgerät verbunden und der Proband angewiesen, sich nicht zu bewegen.

Daraufhin folgte die Messung bei der vom Gerät vorgegebenen konstanten Stromstärke von 0,4 mA und einer Frequenz von 50 Hz. Dabei wurde über ein Elektrodenpaar ein konstanter, nicht spürbarer Strom in den Körper eingeleitet. Mit dem anderen Elektrodenpaar wurde der körperabhängige Spannungsabfall gemessen, aus der die Resistanz (Rz) und die Reaktanz (Xc) abgeleitet wurden. [73, 74] Rz und Xc beschreiben

dabei Teilwiderstände des Wechselstromwiderstandes des Körpers, auf die hier nicht im Detail eingegangen werden sollen.

Aus diesen Messwerten und unter Einbeziehung des Gewichts, der Körpergröße und des Alters wurden im Anschluss mit zu Hilfenahme der Software „Bodygramm Plus 1.2.0.2“ der Firma *Akern SRL, Pontassieve, Florenz, Italien* die Anteile der Körperkompartimente errechnet. Darunter fielen sowohl absolute, als auch relative Werte unter anderem für Muskelmasse, Fettmasse und Fettfreie Masse. Daneben wurden auch noch verschiedene Indizes berechnet. Analog zum BMI wurden dafür die Absolutwerte der Teilmassen (z.B. MM, FM, FFM) in Verhältnis zur quadrierten Körpergröße gebracht.

2.2.4 Fahrradergometertest

Beim Fahrradergometertest kam das *Ergobike Premium 8i* der Firma *daum electronic gmbh, Fürth, Deutschland* und das *MONARK LC7 TT SN* der Firma *Cosmed, Rom, Italien* zum Einsatz. Der Wechsel auf das Gerät von MONARK erfolgte auf Grund einer Neuausstattung der Leistungsdiagnostik bei *Predia – Sport & Gesundheitszentrum, Würzburg*. Zur Überwachung der Herzaktivität wurde der Proband mit einem 12-Kanal-EKG ausgestattet. Dafür wurde der Proband gebeten, seinen Oberkörper zu entkleiden. Im Anschluss wurde ein Brustgurt mit sechs Elektroden für die Brustwandableitung und vier Klebeelektroden am Rücken für die Extremitätenableitungen angebracht. Die Sauerstoffsättigung (sO_2) wurde mit Hilfe eines Pulsoxymeter-Clips an einem Finger der linken Hand überwacht. Zur Erfassung des Blutdrucks wurde eine Blutdruckmanschette am rechten Oberarm angebracht.

Der Fahrradergometertest startete mit einer Aufwärmphase bei 30 Watt für 3 Minuten, während der sich der Proband mit dem Gerät vertraut machen und sich auf die anstehende Belastung einstellen konnte. Anschließend begann der eigentliche Test bei gleicher Leistung für 3 Minuten, gefolgt von einer Steigerung der Belastung um 30 Watt alle drei Minuten. Nach 9 Minuten wurde die maximale Belastungsstufe von 120 Watt erreicht, die der Proband für weitere 6 Minuten halten musste. Die Tretfrequenz sollte bei 60 Umdrehungen pro Minute (U/min) liegen. Definierte Abbruchkriterien waren zum

Beispiel eine Tretfrequenz unter 50 U/min über mehr als 30 Sekunden, die subjektive Erschöpfung des Probanden, EKG-Veränderungen oder klinische Zeichen, die auf eine Sauerstoffunterversorgung hingedeutet hätten. (siehe *Anhang 3 Abbruchkriterien*) Traten keine dieser Abbruchkriterien auf, wurde der Test regulär nach 15 Minuten beendet.

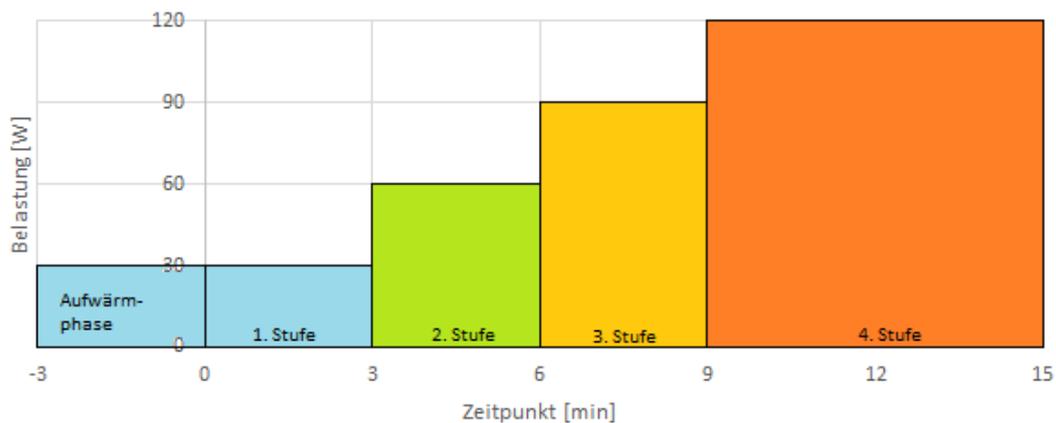


Abbildung 3 Belastungsschema Ergometertest

Tabelle 3 Durchführung Fahrradergometertest

Zeitintervall	Belastung	Tretfrequenz
Aufwärmphase (3 Minuten)	30 Watt	>50 U/min
1. Stufe (0 - 3 min)	30 Watt	>50 U/min
2. Stufe (3 - 6 min)	60 Watt	>50 U/min
3. Stufe (6 - 9 min)	90 Watt	>50 U/min
4. Stufe (9-15 min)	120 Watt	>50 U/min

Monitoring der Vitalparameter

Zur Überwachung der Vitalparameter wurden dem Probanden während des Tests ein 12-Kanal-EKG angelegt. Außerdem diente ein Pulsoxymeter an einem Finger als Kontrolle der Sauerstoffsättigung und der Herzfrequenz. Zur Überwachung des Blutdrucks wurde eine manuelle Blutdruckmanschette an den rechten Oberarm

angebracht und damit der Blutdruck in drei-Minuten-Abständen gemessen. Dabei wurde die Belastung nicht unterbrochen. Die erhobenen Vitalparameter wurden handschriftlich auf einem Durchführungsprotokoll vermerkt und zur weiteren Auswertung digitalisiert.

2.2.5 Borg-Skala

Direkt nach Abschluss des Fahrradergometertests wurden die Probanden mittels Borg-Skala nach ihrem subjektiven Belastungs- und Dyspnoeempfinden befragt. Dabei wird sowohl dem Belastungs-, als auch dem Dyspnoeempfinden ein Wert zugeordnet.

Die Borg-Skala reicht von 6 (sehr, sehr leicht) bis 20 (zu stark/ geht nicht mehr). Dabei hat sich Borg an der Herzfrequenz orientiert. Multipliziert man das Ergebnis mit 10, kann man das subjektive Belastungsempfinden mit der Herzfrequenz vergleichen. [75, 76]

2.2.6 Ruhephase

Nach der Durchführung des Fahrradergometertests schloss sich eine zweistündige Ruhephase an, während der sich die Probanden auf eine Liege legen sollten und dort in horizontaler Position den gesamten Zeitraum verbringen sollten. Währenddessen war es den Probanden erlaubt Wasser zu sich zu nehmen. Der Verzehr von anderen Getränken, insbesondere zucker- oder koffeinhaltigen und Nahrungsmitteln wurde den Probanden zu diesem Zeitpunkt untersagt.

Es wurde auch während der Ruhephase regelmäßig eine Überprüfung der Vitalparameter durchgeführt. Diese fand zu vier Zeitpunkten statt. Die erste Überprüfung wurde direkt zu Beginn der Ruhephase durchgeführt (Zeitpunkt 0 min nach Belastung (n.B.)), gefolgt von der zweiten nach fünfzehnminütiger Ruhephase (Zeitpunkt 15 min n.B.), der dritten nach einer Stunde (Zeitpunkt 60 min n.B.) und schließlich der vierten und letzten am Ende der zweistündigen Ruhephase (Zeitpunkt 120 min n.B.). Diese beinhalteten jeweils, ähnlich wie beim Monitoring während des Fahrradergometertests, die Überprüfung des Blutdrucks, der Herzfrequenz,

Sauerstoffsättigung mittels Pulsoxymeters und die Durchführung eines 6-Kanal-EKGs. Zusätzlich dazu wurden zu Beginn und Ende der Ruhephase der Zucker- und Lactatspiegel im Blut mittels Kapillarblut aus dem Ohrläppchen durchgeführt.

2.2.7 Blutentnahme

Die venöse Blutentnahme wurde zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt. Dabei wurden den Probanden jeweils zwei 5ml Serumröhrchen abgenommen. Die Blutentnahme erfolgte mit Serumröhrchen des Vacutainer-Blutentnahmesystems der Firma *BD, Franklin Lakes, NJ, USA* und Perfusionsbesteck Venofix Safety der Firma *B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland*. Die erste Blutabnahme wurde während der Erhebung der Basisparameter durchgeführt um die Basalwerte der Probanden in Ruhe zu erhalten. Die weiteren Blutentnahmen folgten nach dem Ergometertest. Die erste Blutentnahme erfolgte nach fünfzehn Minuten Ruhe und die zweite nach 120 Minuten am Ende der Ruhephase. Die Serumröhrchen wurden mit der Probanden ID und dem Abnahmezeitpunkt beschriftet. Sie wurden nach Durchführung der Studie in das *Orthopädische Zentrum für Muskuloskelettale Forschung, Würzburg* geliefert. Dort wurde das Serum abpipettiert und jeweils 250µl in 1,5ml Mikroreaktionsgefäße gegeben. Diese wurden mit der Probanden-ID und dem Entnahmezeitpunkt versehen und dann in einem Minus 80°C Schrank bis zur weiteren Analyse verbracht.

2.2.8 Glukose- und Lactatbestimmung

Die Bestimmung der Glukose- und Lactatkonzentration erfolgte an drei Zeitpunkten: vor der Belastung, unmittelbar danach und nach der zweistündigen Ruhephase.

Zum Einsatz kam dabei der Kompaktsensor „*Super GL ambulance M 4.04d*“ der Firma *Dr. Müller Gerätebau GmbH, Freital, Deutschland*. Als Material wurde Kapillarblut verwendet. Dieses wurde durch Punktion eines Ohrläppchens der Probanden gewonnen. Nach Verwerfen des ersten Blutropfens wurde eine Kapillare befüllt. Diese wurde in einem Reaktionsgefäß mit Hämolyse-Systemlösung verdünnt und in das

Gerät gegeben. Das Ergebnis wurde auf dem Display angezeigt, sowie ein Ausdruck erstellt.

2.3 Durchführung der Laboruntersuchung

Die Auswertung der Serumproben erfolgte für die Blutparameter Interleukin 6, Interleukin 8, Follistatin und Follistatin-like-3 im OZMF. Die Proben für Klotho und Myostatin wurden bei der Firma *Immundiagnostik AG, Bensheim, Deutschland* analysiert. Die Bestimmung der Konzentrationen der Steroidhormone erfolgte in der *Medizinischen Klinik & Poliklinik I des Universitätsklinikums Würzburg*.

2.3.1 ELISA

Ein **Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)** gehört zu den Immunoassays. Immunoassays dienen unter anderem zur Konzentrationsbestimmung von Biomolekülen. Dabei kommt es zum Einsatz von verschiedenen Antikörpern, die an spezifische Antigene des Zielmoleküls binden. Bei dieser Studie wurden ausschließlich Sandwich-ELISAs durchgeführt, deren Funktionsprinzip im Folgenden ausführlicher erläutert werden. [1]

Bei Sandwich-ELISAs arbeitet man mit zwei unterschiedlichen Antikörpern, die spezifisch das gesuchte Antigen zwischen sich binden.

In der Vorbereitung wird ein **Fängerantikörper** auf eine feste Phase (z.B. Mikrotiterplatten) aufgetragen und daran gekoppelt. Dieser Fängerantikörper besitzt eine spezifische Bindungsstelle für das gesuchte Antigen. Die feste Phase hat häufig proteinbindende Eigenschaften, sodass diese Antikörper daran adsorbiert werden. Diesen Vorgang nennt man auch *coating*. Nach einer entsprechenden Inkubationszeit wird die Antikörperlösung dann wieder mehrfach ausgespült. Zurück bleiben die an die Platte gebundenen Antikörper.

Der nächste Schritt befasst sich mit der Hintergrundaktivität, die von unspezifisch gebundenen Antikörper-, bzw. Antigenmolekülen hervorgerufen wird und zur einer Verfälschung der Ergebnisse führen kann. Deshalb werden die freien Protein-Bindungsstellen der festen Phase mittels eines Block-Puffers blockiert. Dies verhindert

diese ungewünschte Adsorption und die Hintergrundaktivität kann auf ein Minimum reduziert werden. Danach folgt eine erneute Inkubationszeit und Spülung der Platten.

[1]

Nun folgt die eigentliche Durchführung des ELISAs. Dafür wird die Antigen-Lösung, bzw. deren Verdünnung auf die vorbereiteten Platten aufgetragen. Dabei binden die entsprechenden Antigene an die **Fängerantikörper** und werden so an der Platte fixiert. Nach einer gewissen Inkubationszeit wird die Antigenlösung wieder (mehrfach) abgewaschen und damit die ungebundenen Proteine entfernt.

Im nächsten Schritt kommt der zweite Antikörper zum Einsatz: Der **Detektionsantikörper**. Dieser ist ebenso spezifisch für das Antigen, allerdings mit einem Enzym gekoppelt. Er bindet nun an ein anderes Epitop des Antigens und ist somit ebenso an die Platte gekoppelt. Die ungebundenen Antikörper werden wieder nach einer gewissen Inkubationszeit mittels eines Wasch-Puffers entfernt.

Zur Messung der Enzymaktivität wird nun Enzymsubstrat hinzugefügt. Dieses ist ursprünglich häufig farblos und wird durch das Enzym in ein farbiges Produkt umgesetzt. Nach einer festgelegten Zeit wird diese Reaktion durch Zugabe einer Stopplösung unterbrochen. Die Menge an umgesetztem Substrat wird dann photometrisch bestimmt. Dazu wird die Probe in ein Photometer gegeben und die Absorptionseigenschaft der Lösung für Licht einer bestimmten Wellenlänge gemessen. Dabei korreliert dieser Wert mit der Konzentration des Antigens. Dieser Vorgang ist nochmal schematisch in *Abbildung 5* dargestellt.

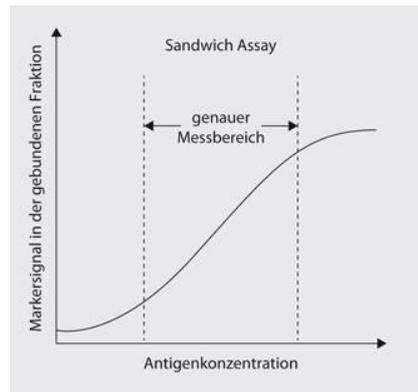


Abbildung 4 Messbereich Sandwich ELISA
(modifiziert nach Luttmann et al.[1])

Angepasst mit Erlaubnis von Springer Nature: Springer Berlin; Der Experimentator: Immunologie; Quantitative Immunoassays; Luttmann et al.; 2014

Zur quantitativen Auswertung benötigt man noch eine Standardkurve. Diese wird durch Durchführung des ELISAs mit Proben, bei denen die Antigen-Konzentration bekannt ist, ermittelt. Erstellt man aus diesen Werten nun einen Graphen, ergibt sich eine sigmoide Form (siehe *Abbildung 4*). In einem bestimmten Bereich liegt eine nahezu lineare Abhängigkeit zwischen Absorption und Konzentration vor. Hieraus ergibt sich ein genauer Messbereich, in dem die Ergebnisse liegen sollten. Liegen die Messwerte ober- oder unterhalb kann man sie zwar durch Extrapolation ermitteln, sie weisen aber eine erhebliche Ungenauigkeit auf und werden deswegen nicht zur Auswertung herangezogen. Um das zu vermeiden muss darauf geachtet werden, die Verdünnung der Proben so anzupassen, dass das Ergebnis in den gewünschten Messbereich fällt. [1, 77] Trotzdem kann es vorkommen, dass die Messergebnisse außerhalb des gewünschten Bereichs fallen. Zum einen kann die Antigen-Konzentration schon in der unverdünnten Probe unter der Nachweisgrenze liegen. Zum anderen beruht die Verdünnung der Proben auf dem Augenmaß und der Erfahrung des Durchführendens, sodass die Konzentrationen auch nach Verdünnung erneut außerhalb des Messbereichs liegen kann. Alle im OZMF durchgeführten ELISAs wurden zur Qualitätskontrolle zweifach ausgeführt.

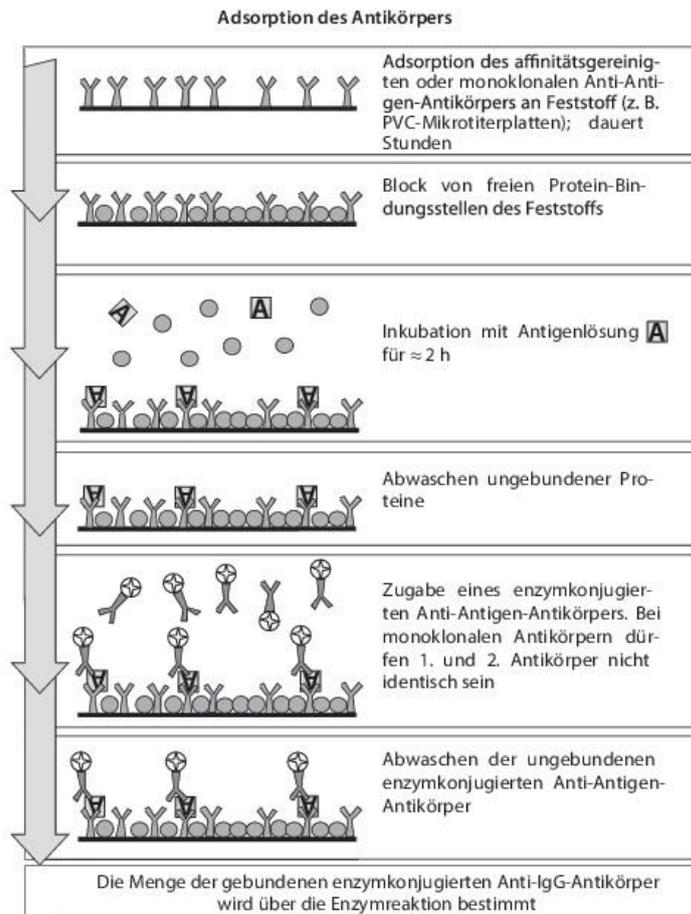


Abbildung 5 Funktionsweise Sandwich-ELISA (modifiziert nach Rehm und Letzel) [77]

angepasst mit Erlaubnis von Springer Nature: Springer Berlin; Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics; Antikörper und Aptamere; Rehm, H., Letzel, T.; 2016

2.3.1.1 Myostatin und Klotho

Die ELISAs für Myostatin und Klotho wurden extern bei der Firma *Immundiagnostik AG, Bensheim*, Deutschland durchgeführt.

Dafür wurden jeweils zwei 250µl-Reaktionsgefäße pro Proband und Zeitpunkt aus dem -80°C Schrank in mit Trockeneis gefüllte isolierte Transportboxen verbracht und per Kurier nach Bensheim geschickt.

Die Analysen wurden im Rahmen einer Kooperation dort durchgeführt, die Ergebnisse der Konzentrationsbestimmung wurden zugeschickt.

2.3.1.2 Follistatin

Zur Durchführung des Follistatin – ELISAs wurde das Human Follistatin *Standard ABTS ELISA Development Kit* (Katalognummer: 900-K299) der Firma *PeptoTech GmbH, Hamburg, Deutschland* benutzt. Die Durchführung des Versuchs erfolgte exakt nach Herstellerangaben.

Zur Analyse musste keine weitere Verdünnung der Serumproben erfolgen.

2.3.1.3 Follistatin-Like-3

Die Analyse von FSTL-3 erfolgte mittels *Human FLRG DuoSet ELISA* (Katalognummer: DY1288B) der Firma *R&D Systems Inc., Minneapolis, USA*. Bei der Durchführung des Versuchs wurde sich genau an die Herstellerangaben gehalten.

Mit einigen Proben für FSTL-3 wurden vor der Durchführung des eigentlichen Tests einige Stichproben durchgeführt um die benötigte Verdünnung herauszufinden. Diese wurde im Anschluss auf 1:50 festgelegt und auf alle Proben angewandt.

2.3.1.4 Interleukin 6

Zur Bestimmung von Interleukin 6 wurde das *Human IL-6 ELISA Development Kit* (Katalognummer: 900-K16) der Firma *Peptotech GmbH, Hamburg, Deutschland* verwendet. Die Durchführung erfolgte genau nach Anweisungen des Herstellers.

Primär wurden die Seren 1:5 verdünnt. Einige Proben mussten allerdings noch schrittweise bis 1:200 nachverdünnt werden, nachdem es, schon mit dem bloßen Auge erkennbar, zu einem übermäßigen Substratumsatz kam, der weit außerhalb des gewünschten Messbereichs lag.

2.3.1.5 Interleukin 8

Für Interleukin 8 wurde das *Human IL-8 Development Kit* (Katalognummer: 900-K18) der Firma *PeptoTech GmbH, Hamburg, Deutschland* verwendet. Die Durchführung erfolgte ebenso genau nach Anleitung des Herstellers.

Bei den Proben für IL-8 musste die Konzentration nicht weiter angepasst werden.

2.3.2 Steroidpanel

Die Analyse der Steroidhormonkonzentrationen erfolgte in der *Zentraleinheit Klinische Massenspektrometrie* der *Medizinische Klinik & Poliklinik I* des *Universitätsklinikums Würzburg*. Dort kam das *MassChrom Steroiden Panel* der Firma *Chromsystems, München, Deutschland* zum Einsatz. Dieses Panel konnte mit Hilfe von Massenspektrometrie eine quantitative Bestimmung der Konzentrationen von insgesamt fünfzehn Steroidhormonen (Kortikosteron, Aldosteron, Progesteron, 17-Hydroxyprogesteron, 11-Deoxykortisol, Kortisol, Kortison, Dehydroandrosteron, DHEA, DHEAS, Androstenedion, Testosteron, Dihydrotestosteron, 21-Deoxykortisol, 11-Deoxykortikosteron und Östradiol) durchführen, von denen für diese Arbeit nur die Mineralokortikoide und Glukokortikoide, sowie deren Vorstufen betrachtet wurden. Die Korrektheit der Messergebnisse wurde mittels der für das Labor üblichen Qualitätskontrollen gewährleistet.

2.4 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Daten und deren grafischer Aufarbeitung wurden die Programme „IBM SPSS Statistics – Version 25“ der Firma *IBM, Armonk, NY, USA* und „Microsoft Excel 2016“ von *Microsoft Corp., Redmond, WA, USA* verwendet.

Alle Daten wurden zuerst dem Shapiro-Wilk Test auf Normalverteilung unterzogen. Dabei konnte für viele Werte keine Normalverteilung angenommen werden. Zusätzlich dazu fanden sich in den erhobenen Daten einige Ausreißer, sodass zur Beschreibung der Median anstatt des Mittelwerts herangezogen wurde. Falls nicht anders bezeichnet, wurden in dieser Arbeit die Daten mit Hilfe des Medians (1. Quartil - 3. Quartil) beschrieben. Außerdem wurden die Werte mittels Boxplots dargestellt. Dabei wurden geringere Ausreißer (1,5- 3-fachen Interquartilsabstand) mit einem „o“ gekennzeichnet. Extreme Ausreiser (> dreifachen Interquartilsabstand; markiert mit „*“) wurden teilweise zur besseren Veranschaulichung der Daten aus den Grafiken exkludiert.

Um die Messwerte der Biomarker der verschiedenen Zeitpunkte zu vergleichen, wurde der Friedman-Test durchgeführt. Kam dabei ein signifikanter Unterschied zwischen den Zeitpunkten heraus, wurde ein paarweiser Vergleich mittels Posthoc-Test (Dunn-Bonferroni-Test) durchgeführt. Dabei wurde der p-Wert unter Berücksichtigung der Bonferroni-Korrektur als $p_{angepasst}$ ausgegeben.

Um Korrelationen zwischen den Biomarker-Ergebnissen und Daten aus dem Fragebogen, zur kardiovaskulären und metabolischen Reaktion auf das körperliche Training zu finden, wurde die Spearman-Korrelation angewandt.

Das Signifikanzniveau wurde bei allen verwendeten Tests auf 5% festgelegt. Lag der p-Wert unter $p < 0,05$ konnte die Nullhypothese verworfen und die Alternativhypothese angenommen werden.

3 Ergebnisse

3.1 Probandenklientel

Die Charakteristika der Probanden sind in *Tabelle 4* dargestellt. Die Probanden waren mit 23 (21,5-27) Jahren relativ jung und bis auf wenige Ausnahmen normalgewichtig bei einem Durchschnitts-BMI von 22,89 (21,38-24,01) kg/m² (siehe *Tabelle 5*).

Tabelle 4 Charakteristika der Probanden

	N	Mdn	(IQA)	[Min; Max]
Alter zum Zeitpunkt der Untersuchung	33	23	(21,5-27)	[18; 36]
Körpergröße [cm]	33	183	(180-187)	[173; 197]
Gewicht [kg]	33	75,7	(70,5-75,7)	[59,8; 122,2]
BMI [kg/m ²]	33	22,89	(21,38-24,01)	[17,41; 34,95]
Σ MET-Stunden	33	10,67	(5,67-25,00)	[0; 48]

Tabelle 5 BMI Gruppeneinteilung

BMI	Einteilung	Häufigkeit	
<18,5	Untergewicht	1	3,0%
18,5 – 24,9	Normalgewicht	27	81,8%
25,0 – 29,9	Übergewicht	4	12,1%
30,0 – 34,9	Adipositas Grad I	1	3,0%

Aus den erhobenen Daten des Fragebogens ergab sich eine relative homogene Probandengruppe in Bezug auf Ernährungsgewohnheiten und Tabakkonsum. Der Großteil der Probanden ernährte sich omnivor (87,9%), hatte keine Lebensmittelunverträglichkeiten (97%), war Nichtraucher (97%) und nahm zu dem Durchführungszeitraum keine Medikamente ein (84,8%). Die sportliche Aktivität in der Freizeit variierte sehr stark von Proband zu Proband und lag in der Summe bei 10,67 (5,67-25,00) MET-Stunden. Am unteren Ende betrieben die Probanden in ihrer Freizeit überhaupt keinen Sport (15,2%). Der aktivste Proband kam auf 6 Stunden intensiv befundenen Sport in der Woche, was 48 MET-Stunden entsprach. Die meisten

Probanden gaben auch keine gesundheitlichen Probleme oder chronische Erkrankungen an (84,8%). Bei Probanden, die gesundheitliche Einschränkungen angaben, sprachen diese nicht gegen die Teilnahme an der Studie.

3.1.1 Bioimpedanzanalyse

Die Ergebnisse der Bioimpedanzanalyse sind in *Tabelle 6* dargestellt. Unter unseren Probanden fand sich im Durchschnitt eine absolute Fettmasse von 15,3 (12,2-19,6) kg, was einem relativen Anteil von 20,8 (16,95-24,1) % entsprach. Die absolute Muskelmasse der Probanden belief sich auf 41,1 (38,3-45,1) kg auf, was wiederum einem Anteil von 42,6 (39,5-45,3) % entsprach.

Tabelle 6 Ergebnis Bioimpedanzanalyse

	N	Mdn	(IQA)	[Min; Max]
TBW _{abs} [l]	33	43,9	(40,8-47,7)	[36,1; 54,1]
TBW _{rel} [%]	33	57,9	(55,5-60,65)	[44,3; 63,6]
ECW _{abs} [l]	33	18,9	(17,6-19,9)	[16,0; 24,4]
ECW _{rel} [%]	33	43,0	(41,8-44,2)	[38,1; 46,1]
BCM [kg]	33	33,9	(31,4-37,0)	[26,5; 41,6]
FM _{abs} [kg]	33	15,3	(12,2-19,6)	[7,5; 48,5]
FM _{rel} [%]	33	20,8	(16,95-24,1)	[12,6; 39,7]
FFM _{abs} [kg]	33	60,2	(55,9-65,0)	[49,7; 73,7]
FFM _{rel} [%]	33	79,2	(75,9-83,1)	[60,3; 87,4]
MM _{abs} [kg]	33	41,1	(38,3-45,1)	[32,6; 50,2]
MM _{rel} [%]	33	42,6	(39,5-45,3)	[28,1; 50,0]
SMM _{abs} [kg]	33	32,4	(30,2-34,0)	[26,2; 36,4]
ASMM _{abs} [kg]	33	24,9	(23,1-26,8)	[20,5; 30,4]
BCMI [kg/m ²]	33	10,1	(9,5-10,9)	[7,9; 13,4]
FMI [kg/m ²]	33	4,5	(3,8-5,8)	[2,5; 13,9]
FFMI [kg/m ²]	33	17,7	(17,0-19,2)	[14,7; 21,9]
MMI [kg/m ²]	33	12,3	(11,5-13,3)	[9,7; 16,2]
SMI [kg/m ²]	33	9,5	(9,2-10,2)	[8,3; 11,2]
ASMI [kg/m ²]	33	7,4	(7,0-7,9)	[6,2; 9,0]

PA [°]	33	6,6	(6,35-6,95)	[5,9; 8,0]
--------	----	------------	-------------	------------

Zur weiteren Auswertung der Bioimpedanzanalyse wurde auf einige Ergebnisse in dieser Arbeit genauer eingegangen.

3.2 Reaktion auf physikalisches Training

Mittels Monitoring der Vitalparameter während der Durchführung des Tests konnte man die kardiovaskulären Anpassungsreaktionen des Körpers beobachten. Das subjektive Belastungs- und Dyspnoeempfinden direkt im Anschluss an den Fahrradergometertest wurde mittels BORG-Skala festgehalten. Außerdem zeigte sich ebenfalls eine Anpassung der Steroidhormonkonzentrationen.

Bei der Durchführung des Tests kam es bei keinem Probanden zu Zwischenfällen. Alle Probanden waren in der Lage den Fahrradergometertest regulär zu beenden. Es traten bei keinem Probanden Ereignisse auf, die zu einem Abbruch des Tests geführt hätten.

3.2.1 Kardiovaskuläre Anpassung

Zur Auswertung der Reaktion des kardiovaskulären Systems lagen die Werte des Monitorings der Vitalparameter vor. Diese umfassten die Herzfrequenz, den systolischen (RR_{SYS}) und diastolischen Blutdruck (RR_{DIA}), sowie den daraus errechneten mittleren arteriellen Druck (MAD).

Die Herzfrequenz in Ruhe befand sich im Median bei 66 (58-77) Schlägen pro Minute. Es zeigte sich ein großer Unterschied zwischen dem Probanden mit der niedrigsten Ruhefrequenz von 41 S/min und demjenigen mit der höchsten Herzfrequenz von 88 S/min. Der systolische Blutdruck in Ruhe lag im Median bei 122 (120-130) mmHg. Zusammen mit dem RR_{DIA} ergab sich daraus ein mittlerer arterieller Blutdruck von 93 (90-97) mmHg. Damit lag das Probandenklientel im Durchschnitt innerhalb der Normwerte für Herzfrequenz und Blutdruck in Ruhe.

Unter Belastung kam es bei allen Probanden zu einem kontinuierlichen Anstieg der Vitalparameter bis zum Ende der Belastung (siehe *Abbildung 6*). Bei der Herzfrequenz bedeutete dies einen Anstieg auf 119 (114-127) S/min am Ende des Ergometertests. Die maximale Herzfrequenz überstieg zu diesem Zeitpunkt bei keinem der Probanden 160 S/min. Damit lag sie noch weit unter der errechneten maximalen Herzfrequenz von 220 minus Lebensalter. Die Belastung machte sich ebenso beim gemessenen Blutdruck

bemerkbar. RR_{SYS} stieg im Median auf 150 (148-165) mmHg, was zu einem Anstieg des MADs auf 103 (100-107) mmHg führte.

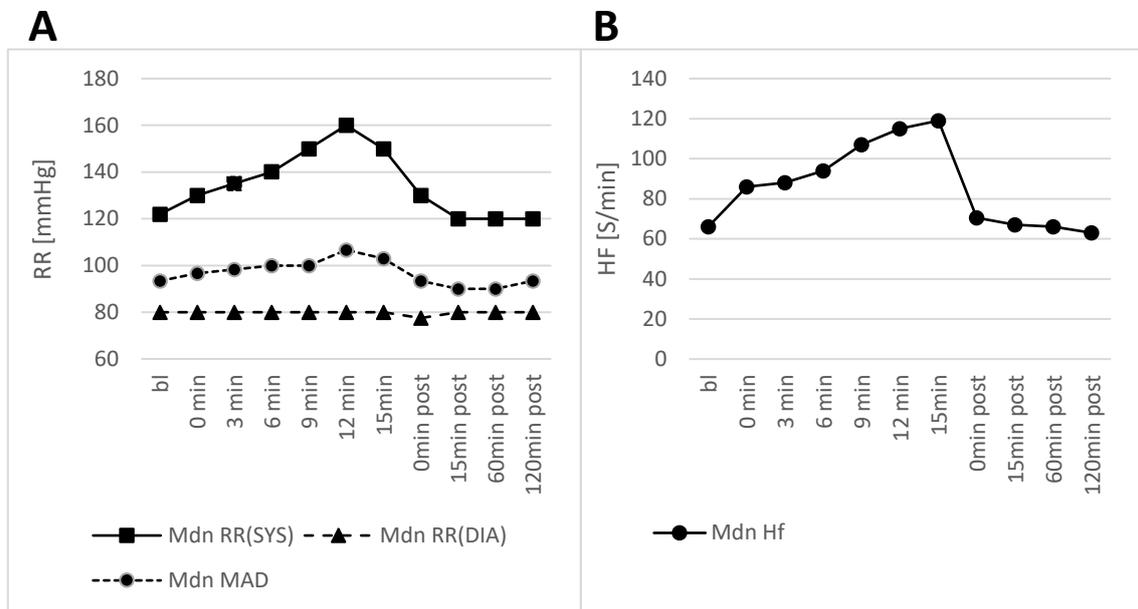


Abbildung 6 Blutdruck (A) und Herzfrequenz (B) im Verlauf: dargestellt ist jeweils der Median der einzelnen Messpunkte

3.2.2 Metabolische Anpassung

Die Anpassung im Energiehaushalt wurde durch die Bestimmung der Glukose- und Lactatkonzentration zu drei Zeitpunkten erfasst. Diese Zeitpunkte fanden vor, direkt nach und 120 Minuten nach dem Fahrradergometertest statt.

Der mediane basale Glukosespiegel lag bei 4,48 (4,29-4,79) mmol/l. Nach der Durchführung des Ergometertests fiel er auf 4,19 (3,91-4,44) mmol/l ab und veränderte sich nach 120 Minuten kaum mehr (4,20 (4,02-4,49)) mmol/l. Dieser primäre Abfall erwies sich im Friedmann-Test als signifikant ($p_{angepasst} < 0,01$).

Der mediane Lactatspiegel lag vor dem Test bei 1,11 (0,98-1,30) mmol/l und stieg direkt nach dem Test auf 1,48 (1,14-2,01) mmol/l an. Dieser Anstieg stellte sich in der Friedmann-Varianzanalyse als signifikant heraus ($p_{angepasst} = 0,024$). Nach 120 Minuten kam es wieder zu einem signifikanten Abfall ($p_{angepasst} < 0,01$) auf 1,03 (0,87-1,32) mmol/l.

3.2.3 Borg-Skala

Zur Erfassung des subjektiven Empfindens des Ausmaßes der Belastung wurde die Borg-Skala für Belastung und Dyspnoe angewandt. Die Belastung wurde von den Probanden als sehr leicht (8) bis sehr schwer (16) und das Dyspnoeempfinden zwischen nicht vorhanden (6) bis sehr stark (16) eingeschätzt.

3.2.4 Hormonelle Anpassung

3.2.4.1 Aldosteron

Der Basalwert von Aldosteron belief sich auf 49,7 (20,2-85,5) ng/l. Dieser erhöhte sich 15 Minuten nach der Belastung auf 99,8 (31,2-135,6) ng/l. Das entsprach einen Anstieg um 46,3 (3,7-124,8) %. Bei der letzten Blutentnahme nach der zweistündigen Ruhephase fiel der Aldosteronspiegel im Median noch unter das Ausgangslevel hinaus ab auf 21,8 (10,5-30,1) ng/l, was einer prozentualen Änderung von -49,3 (-77,6- -33,67) % im Vergleich zum Ausgangswert in Ruhe entsprach (siehe *Abbildung 7*).

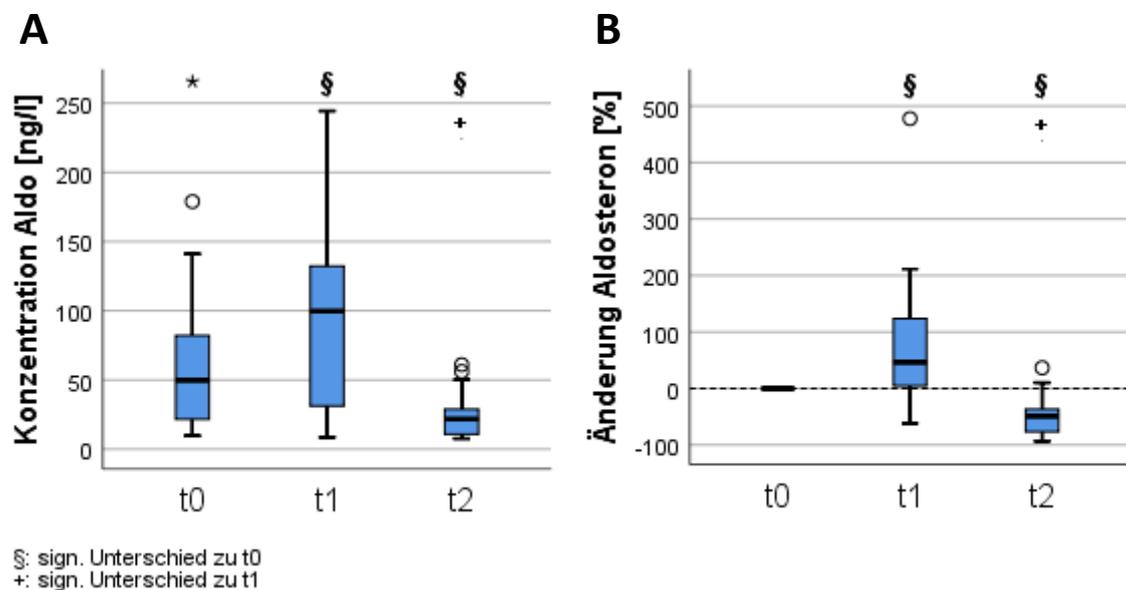


Abbildung 7 Verlauf der absoluten Aldosteron-Konzentrationen (A) und Änderung der Aldo-Konzentration bezogen auf den t0-Wert (B): Dargestellt sind die Zeitpunkte basal (t0), 15 min n.B. (t1) und 120min n.B. (t2); signifikante Unterschiede wurden mittels Friedman-Test ermittelt und in der Grafik markiert

Der Unterschied der Konzentrationen zwischen den einzelnen Zeitpunkten stellte sich mittels eines durchgeführten Friedman-Test als hochsignifikant heraus ($\chi^2(2) = 44,909$; $p < 0,01$; $n = 33$). Ein anschließender Post-Hoc-Test (Dunn-Bonferroini-Test) konnte den signifikanten Unterschied zwischen Basalwert und 15 Minuten nach Belastung (n.B.) ($p_{angepasst} = 0,029$), zwischen Basalwert und 120 Minuten n.B. ($p_{angepasst} < 0,01$) und zwischen 15 Minuten und 120 Minuten n.B. ($p_{angepasst} < 0,01$) nachweisen.

3.2.4.2 Kortisol

Der Median der Basallevel von Kortisol belief sich auf 9,2 (6,0-14,9) $\mu\text{g/dl}$. Im Verlauf fand sich 15 Minuten nach der Belastung im Durchschnitt ein Abfall der Konzentration um 32,6 (28,4-41,5) Prozent auf 6,5 (4,1-9,5) $\mu\text{g/dl}$. Nach 120 Minuten fiel dieser Wert weiter ab auf 5,0 (3,1-6,6) $\mu\text{g/dl}$. Das entsprach im Vergleich zum Basalwert einem Abfall um 55,0 (28,4-61,6) Prozent (siehe *Abbildung 8*)

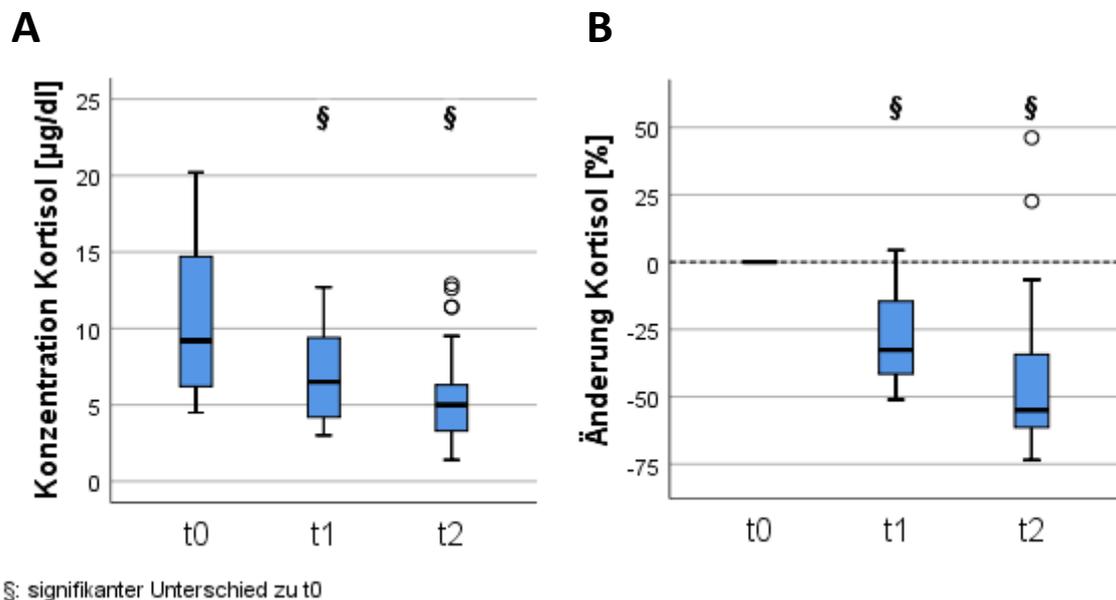


Abbildung 8 Verlauf der absoluten Kortisol-Konzentrationen (A) und Änderung der Kortisol-Konzentration bezogen auf den t0-Wert (B): Dargestellt zu den Zeitpunkten basal (t0), 15min n.B. (t1) und 120min n.B. (t2); Signifikante Unterschiede zwischen t0-Wert und anderen Zeitpunkten wurden mit einem § markiert, die Berechnung erfolgte mit der Friedman-Varianzanalyse

Statistisch war dieser beschriebene Unterschied mittels eines durchgeführten Friedmann-Tests signifikant ($\chi^2(2) = 42,606$; $p < 0,01$; $n = 33$). Der Post-Hoc-Test wies einen signifikanten Unterschied zwischen Basalwert und 15 Minuten n.B. ($p_{angepasst} < 0,01$) und zwischen Basalwert und 120 Minuten n.B. ($p_{angepasst} < 0,01$) nach. Der Unterschied zwischen t1 und t2 stellte sich als nicht signifikant heraus ($p_{angepasst} = 0,109$).

Die im Rahmen der Massenspektrometrie mitbestimmten Vorläufer-Steroide werden in dieser Arbeit nicht speziell mit analysiert und beurteilt. Sie lassen jedoch sämtlich darauf schließen, dass bei keinem Probanden Enzymdefekte der Nebenniere vorlagen, die eine Defizienz in der Substratverarbeitung verursachten und so indirekt das Ergebnis hätten beeinflussen können.

3.3 Biomarker

3.3.1 Myostatin

Der Basalwert von Myostatin belief sich im Median auf 23,3 ng/ml. Im weiteren Verlauf veränderte sich dieser Median nur leicht, am stärksten 15 Minuten nach der Belastung auf 25,1 ng/ml, was im Median einen Anstieg um 8,67% entsprach. Nach zwei Stunden Ruhephase ging die Konzentration wieder auf *Mdn*= 23,2 ng/ml. Diese doch sehr ähnlichen Konzentrationen ergaben sich allerdings nur rein rechnerisch. Betrachtet man die Minima und Maxima der jeweiligen Werte, fällt ein großer Bereich auf, bei dem es sowohl zu starken Abfällen, als auch zu starken Anstiegen kam. Dies wurde auch nochmal in *Abbildung 9* graphisch dargestellt.

Ein durchgeführter Friedman-Test ($\chi^2(2) = 0,79$, $p = 0,674$, $n = 33$) konnten keine signifikanten Unterschiede der Konzentrationen zu den drei verschiedenen Zeitpunkten nachweisen.

	MSTN (t0) [ng/ml]	MSTN (t1) [ng/ml]	MSTN (t2) [ng/ml]	$\Delta\%$ MSTN (t1)	$\Delta\%$ MSTN (t2)
N	33	33	33	33	33
Mdn (IQA)	23,3 (19,6-28,6)	25,1 (19,4-29,9)	23,2 (20,2-29,9)	8,67 (-17,2-20,2)	1,550 (-24,5-28,6)
[Min; Max]	[14,6; 41,2]	[2,5; 46,2]	[11,1; 46,7]	[-88,84; 49,03]	[-56,08; 124,42]

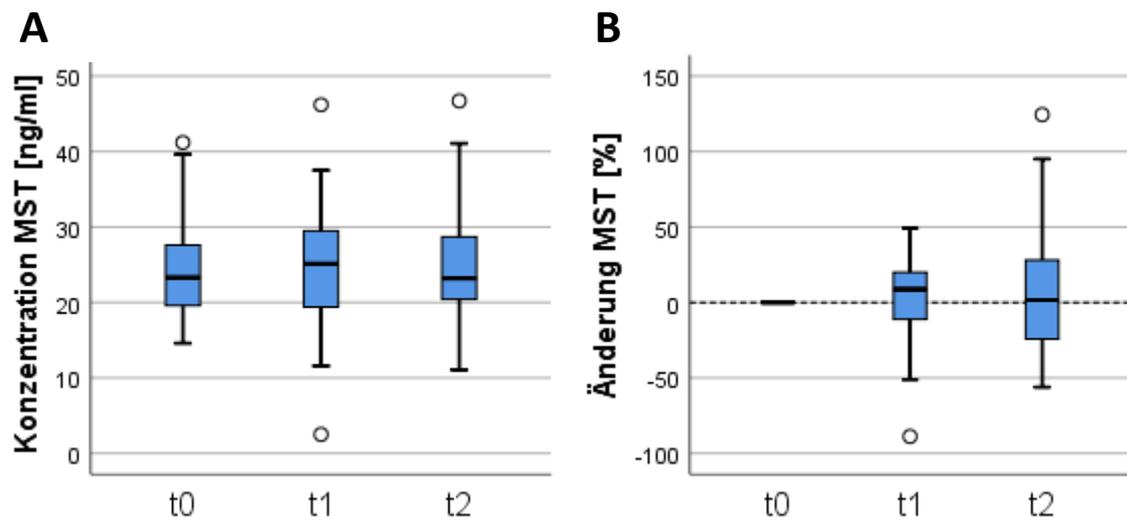


Abbildung 9 Verlauf der absoluten MSTN-Konzentrationen (A) und Änderung der MSTN-Konzentration bezogen auf den t0-Wert (B): Auf der x-Achse sind die verschiedenen Messzeitpunkte dargestellt: t0= basal, t1= 15min n.B., t2= 120min n.B.

3.3.2 Follistatin

Die Konzentration von Follistatin im Serum betrug im Median 231,93 pg/ml. Nach der Belastung zum Zeitpunkt 15 Minuten n.B. lag der Median bei 281,47 pg/ml und zum Zeitpunkt 120 Minuten n.B. bei 254,22 pg/ml. Durch große Varianz der Messwerte muss man diese Ergebnisse allerdings mit Vorsicht betrachten (siehe *Abbildung 10*). So kam es bei der prozentualen Änderung zum Zeitpunkt t2 zu einem Abfall um 8,9%, obwohl die Absolutwerte einen Anstieg anzeigten. Analog zu Myostatin konnten bei den prozentualen Änderungen sowohl Konzentrationsabfälle, als auch -anstiege beobachtet werden.

Auch rechnerisch ergab der Friedman Test keinen signifikanten Unterschied zwischen den drei verschiedenen Zeitpunkten ($\chi^2(2) = 0,581$, $p = 0,748$, $n = 31$).

	FST (t0) [ng/ml]	FST (t1) [ng/ml]	FST (t2) [ng/ml]	$\Delta\%$ FST (t1)	$\Delta\%$ FST (t2)
N	33	32	32	32	32
Mdn (IQA)	231,9 (172,0- 356,4)	281,47 (138,2- 402,0)	254,22 (160,9-293,4)	4,4 (-11,9-27,0)	-8,9 (-28,1-27,8)
[Min; Max]	[52,9; 508,9]	[37,5; 526,0]	[57,8; 545,6]	[-65,1; 133,5]	[-69,9; 212,9]

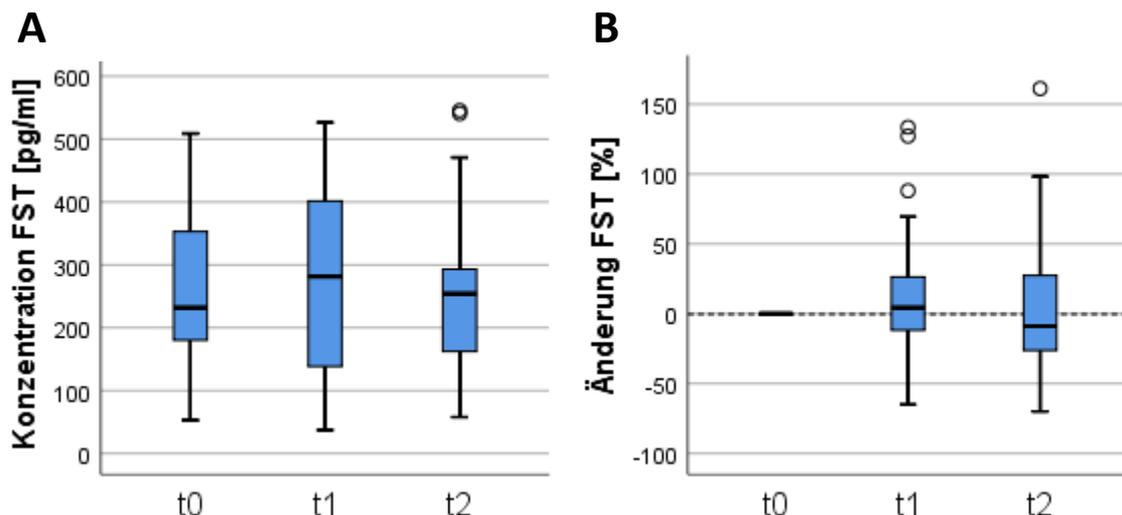


Abbildung 10 Verlauf der absoluten FST-Konzentrationen (A) und Änderung der FST-Konzentration bezogen auf den t0-Wert (B): Auf der x-Achse sind die verschiedenen Messzeitpunkte dargestellt: t0= basal, t1= 15min n.B., t2= 120min n.B.;

3.3.3 Follistatin-like-3

Der Basalwert von FSTL3 betrug im Median 3,97 ng/ml und veränderte sich im Verlauf kaum. Diese prozentuale Änderung bewegte sich in einem Bereich zwischen -7,00 % und +6,96% zum Zeitpunkt 15 Minuten, bzw. zwischen -9,78% und +13,06% zum Zeitpunkt 120 Minuten. Diese Werte sind in *Abbildung 11* dargestellt.

Rechnerisch kam auch der Friedmann-Test zum Ergebnis, dass kein signifikanter Unterschied der Konzentrationen zu den drei verschiedenen Zeitpunkten ($\chi^2(2) = 4,065$; $p = 0,131$; $n = 31$) existiert.

	FSTL3 (t0) [ng/ml]	FSTL3 (t1) [ng/ml]	FSTL3 (t2) [ng/ml]	$\Delta\%$ FSTL3 (t1)	$\Delta\%$ FSTL3 (t2)
N	31	32	32	31	31
Mdn (IQA)	3,97 (3,78-4,23)	3,90 (3,75-4,14)	3,95 (3,72-4,16)	-1,35 (-3,86-0,65)	0,06 (-4,38-2,78)
[Min; Max]	[3,18; 4,41]	[3,33; 4,44]	[3,30; 4,41]	[-7,00; 6,96]	[-9,78; 13,06]

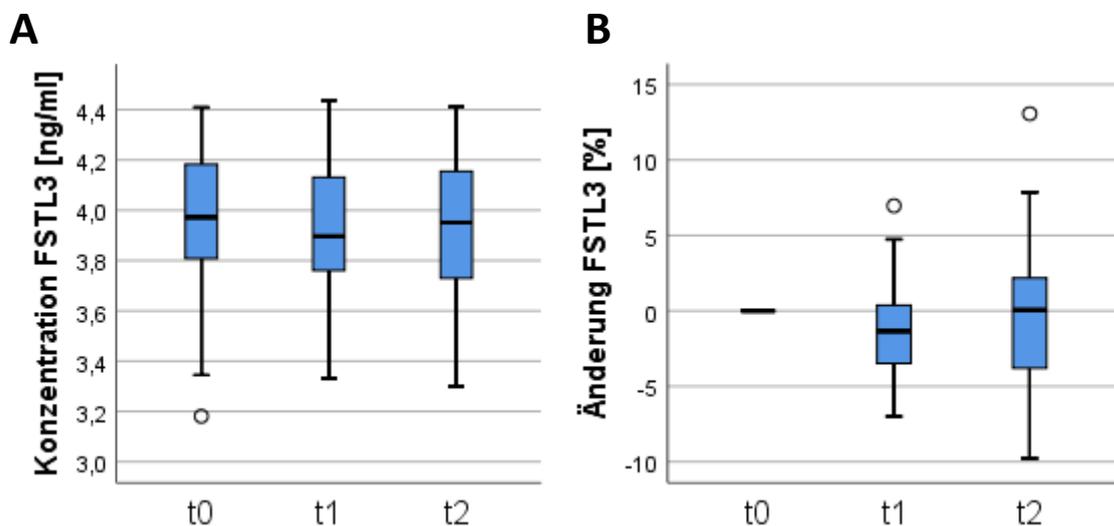


Abbildung 11 Verlauf der absoluten FSTL3-Konzentrationen (A) und Änderung der FSTL3-Konzentration bezogen auf den t0-Wert (B): Auf der x-Achse sind die verschiedenen Messzeitpunkte dargestellt: t0= basal, t1= 15min n.B., t2= 120min n.B.;

3.3.4 Interleukin 6

Die Werte von IL-6 waren sehr weit gestreut. Im Median lag der Basalwert bei 5,10 ng/ml. Im weiteren Verlauf kam es zu einem minimalen Abfall der Konzentrationen auf $Mdn= 4,59$ ng/ml nach 15 Minuten und auf $Mdn=4,41$ ng/ml nach 120 Minuten. Es kam bei den Probanden sowohl zu Anstiegen, als auch zu Abfällen des IL-6-Spiegels.

Ein durchgeführter Friedman-Test konnte keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Zeitpunkten feststellen ($\chi^2(2)= 2,000$; $p= 0,368$; $n= 21$).

	IL-6 (t0) [ng/ml]	IL-6 (t1) [ng/ml]	IL-6 (t2) [ng/ml]	$\Delta\%$ IL-6 (t1)	$\Delta\%$ IL-6 (t2)
N	24	24	26	22	23
Mdn (IQA)	5,10 (3,22-7,16)	4,59 (2,92-5,60)	4,41 (2,50-6,52)	-3,14 (-17,63-45,27)	-4,87 (-29,08-31,96)
[Min; Max]	[0,84; 70,63]	[0,34; 138,27]	[0,30; 116,42]	[-59,67; 153,13]	[-95,89; 146,67]

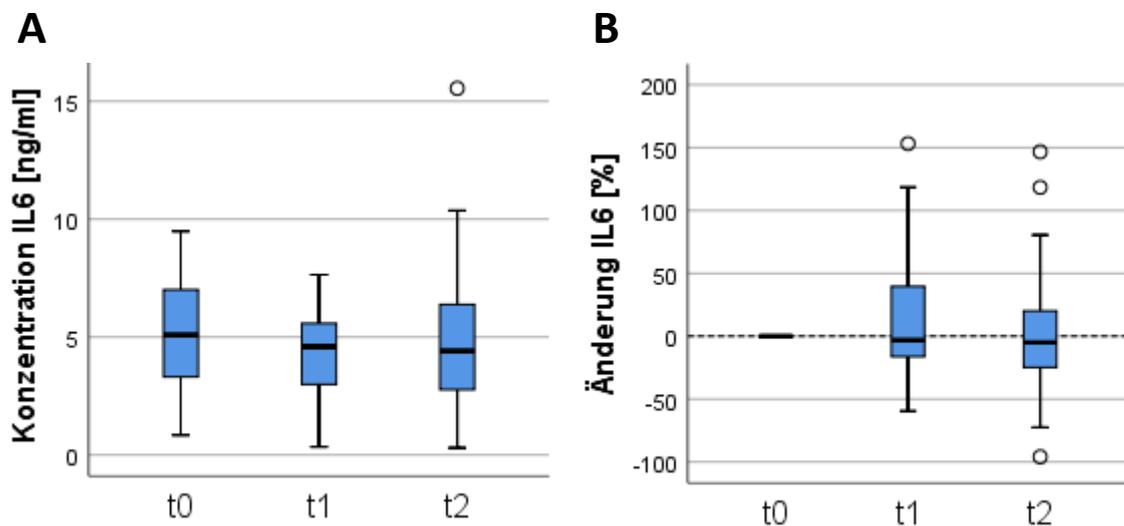


Abbildung 12 Verlauf der absoluten IL-6-Konzentrationen (A) und Änderung der IL-6-Konzentration bezogen auf den t0-Wert (B): Auf der x-Achse sind die verschiedenen Messzeitpunkte dargestellt: t0= basal, t1= 15min n.B., t2= 120min n.B.; Extremwerte (>dreifachen IQA) wurden zur besseren Darstellung aus der Grafik ausgeschlossen

3.3.5 Interleukin 8

Die einzelnen Werte der IL-8-Konzentration zu den verschiedenen Zeitpunkten sind in der folgenden Tabelle dargestellt. Dort fällt, wie schon bei IL-6, eine sehr große Streuung der einzelnen Ergebnisse auf.

Ein durchgeführter Friedmann-Test gab zwar primär den Unterschied zwischen den Werten als signifikant an ($\chi^2(2) = 6,077$; $p = 0,048$; $n = 26$). Beim durchgeführten Post-Hoc Test, konnte man aber nach Anwendung der Bonferroni-Korrektur keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Zeitpunkten finden. Der Unterschied zwischen t1 und t2 war dabei der deutlichste und fast signifikant ($p_{angepasst} = 0,055$).

	IL-8 (t0) [ng/ml]	IL-8 (t1) [ng/ml]	IL-8 (t2) [ng/ml]	$\Delta\%$ IL-8 (t1)	$\Delta\%$ IL-8 (t2)
N	30	30	28	28	26
Mdn (IQA)	117,35 (79,61-173,52)	123,93 (80,89-205,12)	97,55 (59,59-134,91)	0,77 (-21,41-32,20)	-10,45 (-38,63-7,65)
[Min; Max]	[24,45; 536,43]	[40,53; 552,70]	[35,81; 414,34]	[-54,66; 749,41]	[-89,34; 1380,26]

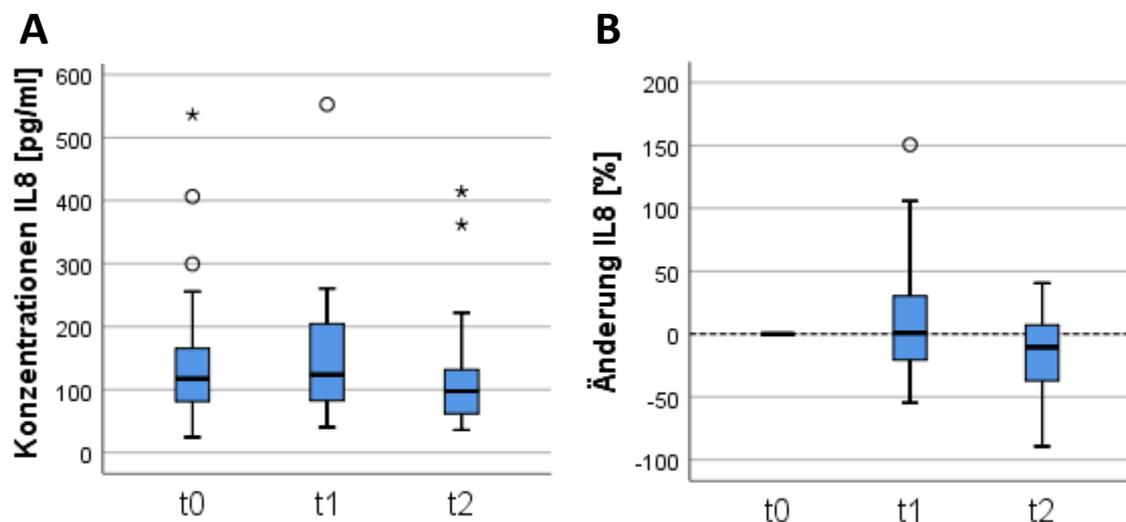


Abbildung 13 Verlauf der absoluten IL-8-Konzentrationen (A) und Änderung der IL-8-Konzentration bezogen auf den t0-Wert (B): Auf der x-Achse sind die verschiedenen Messzeitpunkte dargestellt: t0= basal, t1= 15min n.B., t2= 120min n.B.; Extremwerte (>dreifachen IQA) wurden teilweise zur besseren Darstellung aus der Grafik ausgeschlossen

3.3.6 Klotho

Die Konzentration von Klotho in Ruhe betrug im Median 28,10 ng/ml und fiel 15 Minuten nach dem Ergometertest im Durchschnitt minimal auf $Mdn= 27,50$ ng/ml. Dies entsprach einem minimalen prozentualen Abfall von $Mdn= -1,22$ %. Zwei Stunden nach der Belastung lag die Konzentration im Durchschnitt bei $Mdn= 26,80$ ng/ml. Das entsprach im Median einen Abfall von $-1,31$ % (dargestellt in *Abbildung 14*). Der Unterschied zwischen den Konzentrationen stellte sich im Friedmann-Test als nicht signifikant dar ($X^2(2)= 2,977$; $p= 0,226$; $n= 33$).

	Klotho (t0) [ng/ml]	Klotho (t1) [ng/ml]	Klotho (t2) [ng/ml]	$\Delta\%$ Klotho (t1)	$\Delta\%$ Klotho (t2)
N	33	33	33	33	33
Mdn (IQA)	28,10 (13,95-40,3)	27,50 (13,90-37,80)	26,80 (13,40-37,80)	-1,22 (-6,27-1,08)	-1,31 (-4,89-3,69)
[Min; Max]	[5,50; 45,90]	[4,60; 50,70]	[5,40; 46,20]	[-20,39; 71,11]	[-38,83; 57,78]

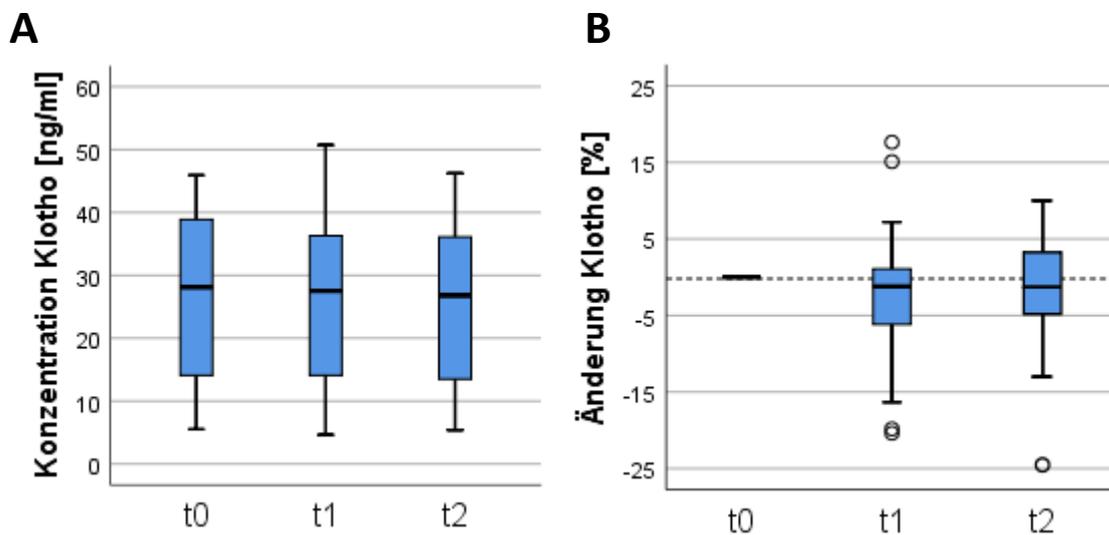


Abbildung 14 Verlauf der absoluten Klotho-Konzentrationen (A) und Änderung der Klotho-Konzentration bezogen auf den t0-Wert (B): Auf der x-Achse sind die verschiedenen Messzeitpunkte dargestellt: t0= basal, t1= 15min n.B., t2= 120min n.B.; Extremwerte (>dreifachen IQA) wurden zur besseren Darstellung aus der Grafik ausgeschlossen

3.4 Korrelationen

Es wurde nach möglichen Einflussfaktoren auf die Absolutwerte der Biomarker zu den verschiedenen Zeitpunkten, bzw. deren prozentuale Änderung zwischen den Zeitpunkten nach dem Ergometertest und dem Basalwert gesucht. Um diese zu identifizieren, wurden die Daten auf Korrelationen zwischen diesen Werten und dem Trainingszustand, der Bioimpedanzanalyse, der kardiovaskulären und metabolischen Antwort auf eine Belastung untersucht.

3.4.1 Myostatin/ Follistatin/ Follistatin-like-3

Bei der Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Spearman zeigten sich teilweise signifikante Korrelationen zwischen den Werten der Bioimpedanzanalyse und den Absolutwerten von Myostatin, allerdings nicht bei deren prozentualer Änderung. Diese Korrelationen sind in *Tabelle 7* dargestellt. Weitere Korrelationen, zum Beispiel zum Trainingszustand (repräsentiert durch die Summe der Metabolischen Äquivalente (MET Stunden) oder kardiovaskulären Vitalparametern ergaben sich bei Myostatin nicht.

*Tabelle 7 Korrelationen zwischen Myostatin und BIA: Dargestellt ist der Korrelationskoeffizient nach Spearman (r_s); Signifikante Korrelationen wurden markiert *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; $N = 33$*

		MSTN (t0)	MSTN (t1)	MSTN (t2)	$\Delta\%$ MSTN (t1)	$\Delta\%$ MSTN (t2)
r_s	Gewicht	-0,297	-0,425*	-0,157	-0,162	0,021
	BMI	-0,293	-0,448**	-0,175	-0,136	0,069
	FM _{abs}	-0,120	-0,272	0,011	-0,178	-0,015
	FM _{rel}	-0,051	-0,238	0,053	-0,210	-0,029
	FFM _{abs}	-0,337	-0,466**	-0,277	-0,149	0,008
	FFM _{rel}	0,051	0,238	-0,053	0,210	0,029
	MM _{abs}	-0,255	-0,476**	-0,345*	-0,256	-0,122
	MM _{rel}	0,082	0,266	-0,036	0,217	0,025
	SMM _{abs}	-0,397*	-0,446**	-0,324	-0,072	0,042

Follistatin zeigte keine Korrelationen zu Werten der Bioimpedanzanalyse oder kardiovaskulären Daten. Allerdings konnte eine signifikante negative Korrelation zwischen der Summe aller MET-Minuten und der prozentualen Änderung von FST zu den Zeitpunkten t1 und t2 gefunden werden ($\Delta\%$ FST (t1): $r_s = -0,498$, $p < 0,01$, $N = 32$; $\Delta\%$ FST (t2): $r_s = -0,375$, $p < 0,05$, $N = 32$). Außerdem wurde eine positive Korrelation zwischen einzelnen Absolutwerten von FST und Lactatwerten gefunden (siehe *Tabelle 8*)

Tabelle 8 Korrelationen FST: Dargestellt ist der Spearman-Korrelationskoeffizient (r_s); Signifikante Korrelationen sind gekennzeichnet *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$

	FST (t0)	FST (t1)	FST (t2)	$\Delta\%$ FST (t1)	$\Delta\%$ FST (t2)
r_s Σ MET-Minuten	0,022	-0,270	-0,306	-0,498**	-0,375*
Lactat (t1)	0,181	0,336	0,354*	0,176	0,002
$\Delta\%$ Lactat (t1)	0,290	0,369*	0,353*	0,052	-0,048

Follistatin-like-3 zeigte ebenfalls keine Korrelation mit den Werten der BIA. Es fand sich allerdings Korrelationen zu kardiovaskulären Daten wie die Herzfrequenz und der MAD. Diese traten bei den Absolutwerten auf, die relativen Änderungen waren nicht betroffen (siehe *Tabelle 9*).

Tabelle 9 Korrelationen FSTL3: Dargestellt ist der Spearman-Korrelationskoeffizient (r_s); Signifikante Korrelationen sind gekennzeichnet *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$

	FSTL3 (t0)	FSTL3 (t1)	FSTL3 (t2)	$\Delta\%$ FSTL3 (t1)	$\Delta\%$ FSTL3 (t2)
r_s HF (bl) [S/min]	0,506**	0,518**	0,500**	-0,057	-0,111
HF (120min n.B.) [S/min]	0,267	0,362*	0,380*	0,076	0,071
MAD (15min) [mmHg]	-0,356*	-0,470**	-0,456**	0,086	0,119

Korreliert man die Myokin-Werte untereinander finden sich einige Korrelationen. Bei Myostatin fällt eine starke Korrelation der Werte untereinander auf. Zusätzlich konnten

signifikante Korrelation zwischen Myostatin und Follistatin festgestellt werden (siehe *Tabelle 10*). Es gab keine weitere Korrelation zu anderen Myokinen.

Tabelle 10 Korrelationen MSTN zu anderen Myokinen: Dargestellt ist der Spearmann-Korrelationskoeffizient (r_s); Signifikante Korrelationen sind gekennzeichnet *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$

	MSTN (t0)	MSTN (t1)	MSTN (t2)	$\Delta\%$ MSTN (t1)	$\Delta\%$ MSTN (t2)
r_s MSTN (t0)	1,000				
MSTN (t1)	0,646**	1,000			
MSTN (t2)	0,191	0,482**	1,000		
$\Delta\%$ MSTN (t1)	-0,282	0,489**	0,399*	1,000	
$\Delta\%$ MSTN (t2)	-0,546**	-0,007	0,651**	0,653**	1,000
FST (t0)	-0,110	-0,292	0,030	-0,349*	-0,004
$\Delta\%$ FST (t1)	-0,233	0,168	0,186	0,422*	0,337
$\Delta\%$ FST (t2)	-0,028	0,304	-0,043	0,481**	0,102

Bei Follistatin konnte man zusätzlich zu der Korrelation mit Myostatin auch noch signifikante Korrelationen der Follistatin-Werten untereinander und zu einigen Werten von IL-6, IL-8 nachweisen. In *Tabelle 11* sind alle signifikanten Korrelation dargestellt. Keine Korrelation konnte zwischen FST und FSTL3 nachgewiesen werden.

Tabelle 11 Korrelationen FST zu anderen Myokinen: Dargestellt ist der Spearmann-Korrelationskoeffizient (r_s); Signifikante Korrelationen sind gekennzeichnet *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$

	FST(t0)	FST (t1)	FST (t2)	$\Delta\%$ FST (t1)	$\Delta\%$ FST (t2)
r_s FST (t0)	1,000				
FST (t1)	0,749**	1,000			
FST (t2)	0,558**	0,808**	1,000		
$\Delta\%$ FST (t1)	-0,139	0,440*	0,425*	1,000	
$\Delta\%$ FST (t2)	-0,591**	-0,144	0,246	0,663**	1,000
$\Delta\%$ MSTN (t1)	-0,349*	-0,053	-0,098	0,422*	0,481**
IL-6 (t1)	0,368	0,326	0,490*	0,265	0,186

IL-6 (t2)	0,125	0,175	0,466*	0,295	0,488*
Δ% IL-6 (t2)	-0,024	-0,016	0,185	0,154	0,448*
IL-8 (t0) [pg/ml]	0,478**	0,265	-0,032	-0,161	-0,399*
IL-8 (t1) [pg/ml]	0,551**	0,600**	0,438*	0,022	-0,218
Δ% IL-8 (t1)	-0,092	0,293	0,499**	0,489**	0,432*
Δ% IL-8 (t2)	-0,445*	-0,151	0,125	0,215	0,383

FSTL3 zeigte wieder Korrelationen unter den FSTL3-Werten. Folgende Tabelle zeigt außerdem signifikante Korrelationen zu Werten von IL-8 und Klotho.

Tabelle 12 Korrelationen FSTL3 zu anderen Myokinen: Dargestellt ist der Spearman-Korrelationskoeffizient (r_s); Signifikante Korrelationen sind gekennzeichnet *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$

	FSTL3 (t0)	FSTL3 (t1)	FSTL3 (t2)	Δ% FSTL3 (t1)	Δ% FSTL3 (t2)
r_s FSTL3 (t0)	1,000				
FSTL3 (t1)	0,867**	1,000			
FSTL3 (t2)	0,798**	0,937**	1,000		
Δ% FSTL3 (t1)	-0,211	0,225	0,243	1,000	
Δ% FSTL3 (t2)	-0,436*	-0,096	0,124	0,732**	1,000
Klotho (t0)	0,1375	-0,074	-0,084	-0,367*	-0,275
Δ% Klotho (t2)	-0,090	0,023	0,144	0,275	0,453*
IL-8 (t0)	-0,086	0,070	0,073	0,351	0,386*
IL-8 (t2)	-0,202	0,093	0,189	0,363	0,516**

3.4.2 Interleukin 6 und Interleukin 8

Bei Interleukin 6 konnten signifikante positive Korrelationen zum BMI und zur absoluten Skelettmuskelmasse gefunden werden. Außerdem fanden sich wiederum Korrelationen der IL-6-Werte untereinander und die schon oben erwähnte Korrelation zu FST.

Tabelle 13 Korrelationen von IL-6: Dargestellt ist der Spearman-Korrelationskoeffizient (r_s); Signifikante Korrelationen sind gekennzeichnet *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$

	IL-6 (t0)	IL-6 (t1)	IL-6 (t2)	Δ% IL-6 (t1)	Δ% IL-6 (t2)
r_s BMI	0,420*	0,098	0,069	-0,082	-0,210

SMM	0,198	0,372	0,078	0,452*	0,029
IL-6 (t1)	0,684**	1,000			
IL-6 (t2)	0,751**	0,803**	1,000		
Δ% IL-6 (t1)	0,022	0,573**	0,317	1,000	
Δ% IL-6 (t2)	0,041	0,356	0,501*	0,512*	1,000
FST (t2)	0,391	0,490*	0,466*	0,162	0,185
Δ% FST (t2)	0,117	0,186	0,488*	0,239	0,448*

IL-8 zeigte wiederum Korrelationen mit kardiovaskulären Daten so wie zum Beispiel der Herzfrequenz am Ende der Belastung (HF (15min)) und der absoluten Skelettmuskelmasse, einem Messergebnis der Bioimpedanzanalyse. Außerdem fanden sich neben den schon oben erwähnten Korrelationen zu FST und FSTL3 Korrelationen zu Klotho. Es wurden auch wieder Korrelationen der IL-8-Werte untereinander gefunden.

Tabelle 14 Korrelationen von IL-8: Dargestellt ist der Spearmann-Korrelationskoeffizient (r_s); Signifikante Korrelationen sind gekennzeichnet *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$

	IL-8 (t0)	IL-8 (t1)	IL-8 (t2)	Δ% IL-8 (t1)	Δ% IL-8 (t2)
r_s HF (15min)	0,145	0,398*	0,382*	0,316	0,270
HF (120min n.B.)	0,256	0,372*	0,041	-0,067	-0,271
SMM	-0,136	-0,082	-0,234	-0,022	-0,419*
Lac (0min n.B.)	-0,102	0,381*	0,271	0,465*	0,535**
Δ% Lac (0min n.B.)	-0,028	0,366*	0,305	0,285	0,377
IL-8 (t1)	0,701**	1,000			
IL-8 (t2)	0,387	0,556**	1,000		
Δ% IL-8 (t1)	-0,625**	-0,041	-0,001	1,000	
Δ% IL-8 (t2)	-0,595**	-0,266	0,347	0,627**	1,000
FST (t0)	0,478**	0,551**	0,085	-0,092	-0,445*
FST (t1)	0,265	0,600**	0,205	0,293	-0,151

FST (t2)	-0,032	0,438*	0,332	0,499**	0,125
Δ% FST (t1)	-0,161	0,022	0,071	0,489**	0,215
Δ% FST (t2)	-0,399*	-0,218	0,131	0,432*	0,383
Δ% FSTL3 (t2)	0,386*	0,325	0,516**	0,013	0,043
Δ% Klotho (t1)	0,316	0,502**	0,502**	0,033	0,004
Δ% Klotho (t2)	0,453*	0,285	0,443*	-0,288	-0,005

3.4.3 Klotho

Bei Klotho fanden sich Korrelationen zu den MET-Minuten und zu Werten der Bioimpedanzanalyse. Dort fällt eine signifikante positive Korrelation zwischen den Absolutwerten von Klotho und der relativen und absoluten Fettmasse auf. Zusätzlich fanden sich wieder neben den schon oben erwähnten Korrelationen zu IL-8 und FSTL3, Korrelationen der Klotho Werte untereinander.

*Tabelle 15 Korrelationen von Klotho: Dargestellt ist der Spearman-Korrelationskoeffizient (r_s); Signifikante Korrelationen sind gekennzeichnet *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$*

	Klotho (t0)	Klotho (t1)	Klotho (t2)	$\Delta\%$ Klotho (t1)	$\Delta\%$ Klotho (t2)
r_s Σ MET-Minuten	-0,017	-0,046	-0,017	-0,406*	-0,074
FM _{abs}	0,445**	0,472**	0,408*	0,096	-0,154
FM _{rel}	0,491**	0,508**	0,449**	0,086	-0,091
FFM _{rel}	-0,491**	-0,508**	-0,449**	-0,086	0,091
MM _{rel}	-0,495**	-0,512**	-0,453**	-0,066	0,136
IL-8 (t0)	0,126	0,202	0,238	0,316	0,453*
IL-8 (t1)	-0,032	0,093	0,062	0,502**	0,285
IL-8 (t2)	-0,124	-0,049	-0,055	0,502**	0,443*
$\Delta\%$ FSTL3 (t1)	-0,367*	-0,332	-0,335	0,095	0,275
$\Delta\%$ FSTL3 (t2)	-0,275	-0,201	-0,216	0,307	0,453*
Klotho (t0)	1,000	0,971**	0,979**	0,230	0,026
Klotho (t1)	0,971**	1,000	0,984**	0,376*	0,088
Klotho (t2)	0,979**	0,984**	1	0,314	0,156
$\Delta\%$ Klotho (t1)	0,230	0,376*	0,314	1	0,271

4 Diskussion

In dieser Arbeit ging es um die Anpassungsreaktionen des menschlichen Organismus an eine körperliche Betätigung. Der Fokus dabei lag auf der Ausschüttung von Zytokinen und Myokinen. Diese Studie konnte nicht nachweisen, dass es zu einer einheitlichen, signifikanten Änderung der Konzentrationen für Myostatin, Follistatin, Follistatin-like-3, Interleukin 6, Interleukin 8 und Klotho als Reaktion auf eine kurze körperliche Belastung innerhalb von zwei Stunden kommt.

4.1 Probandenklientel

Diese Arbeit ist Teil eines großen Projektes, bei dem es um die Detektion von Anpassungsreaktionen von mesenchyalem Gewebe auf eine kurze Belastungssituation bei verschiedenen Bevölkerungsgruppen geht. Der vorliegende Teil beschäftigt sich mit der Kontrollgruppe. Dafür wurden gesunde Männer im Alter zwischen 18 und 36 Jahren eingeschlossen. Ein ähnlicher Altersbereich hat sich auch schon in anderen Fragestellungen als gute Kontrollgruppe herausgestellt. Zum Beispiel wird bei der Definition von Osteoporose die Knochendichte der Patienten bei der Knochendichtemessung mittels Dual-Röntgen-Absorptiometrie mit der Knochendichte von 20-29-Jährigen verglichen.

Auswahlkriterium für die Auswahl der Probanden war neben einer schriftlichen Einwilligung aller Probanden, das passende Alter und eine körperliche Gesundheit, die es den Probanden ermöglichte ohne Risiko am Fahrradergometererprobungsteilzunehmen. Die Akquise der Probanden erfolgte aus dem persönlichen Umfeld des Durchführenden. Dies machte sich auch in der Altersverteilung bemerkbar. 90,9% der Probanden waren zum Zeitpunkt der Durchführung jünger als 30 Jahre. Die sportliche Aktivität, die mittels metabolischen Äquivalenten quantifiziert wurde, war kein Auswahlkriterium. So ließ sich auch die große Varianz in der Verteilung der Freizeitsportaktivität der Probanden erklären (Minimum: 0 MET-Stunden; Maximum: 48 MET-Stunden).

4.1.1 Bioimpedanzanalyse

Zur Einschätzung unserer BIA-Werte wurden als Referenzwerte die Ergebnisse einer Studie von *Kyle et al. [78]* herangezogen.

Unsere Probanden hatten im Vergleich zu Männern im Alter zwischen 25 und 34 Jahren aus der betrachteten Studie eine leicht erhöhte relative Fettmasse (20,8 (16,95-24,1) % vs. 18,2 (15,2-21,9) %). Ebenso fand sich eine leichte Erhöhung der absoluten Fettmasse (15,3 (12,2-19,6) kg vs. 13,2 (10,5-17,0) kg). Die absolute fettfreie Masse zeigte sich allerdings vergleichbar (60,2 (55,9-65,0) kg vs. 60,3 (56,5-63,6) kg). Eine Möglichkeit, wie es zu dieser Abweichung kam, könnte in unserem benutzten Auswahlkriterium ihren Ursprung gehabt haben. Gewicht, Größe oder der Körperbau spielten keine Rolle bei der Auswahl unserer Probanden. Dadurch könnte es durch reinen Zufall zur Auswahl einer Probandengruppe mit leicht erhöhter Fettmasse gekommen sein.

Es existieren allerdings auch andere Studien [79], die andere Referenzwerte für Fettmasse, bzw. fettfreie Masse angaben. Es könnte also Faktoren geben, die Einfluss auf diese Durchschnittswerte nahmen. Zu diesen Faktoren könnte die unterschiedliche Nationalität der Probanden zählen. Bei den betrachteten Studien wurden nämlich Menschen aus unterschiedlichen Ländern untersucht. Außerdem gab es Unterschiede was den Hersteller der Bioimpedanzanalyse-Geräte angeht.

4.2 Studienaufbau

Die Studie bestand aus einem Basisassessment, der eigentlichen viertelstündigen Durchführung des Fahrradergometertests und einer anschließenden zweistündigen Ruhephase. Während der gesamten Durchführung wurde insgesamt drei Mal venöses Blut abgenommen.

4.2.1 Fahrradergometertest

Der Fahrradergometertest wurde auf eine Dauer von 15 Minuten festgelegt und ein Stufenschema bis zu einer Maximalbelastung von 120 Watt angewandt. Der Ergometertest wurde so gestaltet, dass dieses einheitliche Belastungsschema von unterschiedlichen Probandengruppen absolviert werden konnte. Dies geschah im Hinblick darauf, dass dieser Test in zukünftigen Studien auch auf ältere oder schwer beeinträchtigte Personen angewandt werden soll. Außerdem sollte herausgefunden werden, ob auch so ein relativ kurzes Belastungsschema zu der erwünschten Veränderung der Myokin, bzw. Zytokin-Konzentrationen führen kann.

Allerdings führte genau dieses Schema auch zu unterschiedlichen Reaktionen bei den einzelnen Probanden. Die teilnehmenden Probanden hatten teilweise sehr unterschiedliche Fitnesslevel. Das führte dann dazu, dass die subjektive Bewertung des Belastungs- und Dyspnoeempfindens mittels BORG-Skala auch sehr unterschiedlich erfolgte. Dabei wurde die Belastung von einigen als sehr leicht, von anderen hingegen als sehr schwer empfunden.

Um eine möglichst einheitliche Reaktion auf ein Training zu erreichen, benutzen andere Studien eine individuelle maximale Belastungsgrenze. Dabei wurde häufig an einem Termin vor der eigentlichen Durchführung des Tests die maximale Sauerstoffaufnahme (VO_2max) bestimmt. Die Festlegung der Belastung orientierte sich dann an einem Prozentsatz von VO_2max . [23-25, 80, 81] Dieses Modell widerspräche aber dem Grundprinzip eines einfach durchzuführenden Tests, da es einen zweiten vorangehenden Termin geben und außerdem eine Spirometrie erfolgen müsste. Abgesehen davon konnte man auch mit dem in dieser Arbeit benutzten statischen

Modell, trotz der Unterschiede in der subjektiven Einschätzung, eine Belastungsreaktion des Körpers auslösen und nachweisen.

Nachweis einer Belastungssituation

Es konnte auf verschiedene Weise gezeigt werden, dass es zu einer Systemreaktion auf die körperliche Belastung kam. Während des Tests kam es bei allen Probanden zu einem deutlichen Anstieg der Herzfrequenz und des Blutdrucks als direkte Reaktion des kardiovaskulären Systems. Außerdem konnte ein Anstieg der Lactatkonzentration und Abfall der Glukosekonzentration als Reaktion auf die körperliche Betätigung beobachtet werden. Des Weiteren fand sich eine Reaktion des hormonellen Systems, bei der es zu einem deutlichen signifikanten Anstieg der Konzentration von Aldosteron 15 Minuten nach der Belastung kam und diese dann nach der zweistündigen Ruhephase noch unter Ursprungsniveau abfiel, entsprechend der dann horizontalen Körperposition der Probanden. Dieser Anstieg ist auch schon in einer anderen Studie beschrieben worden, bei der die maximale Aldosteron-Konzentration etwas zeitversetzt nach Beendigung der Belastung nachgewiesen wurde. [66] Es ist zu vermuten, dass die Ausschüttung von Aldosteron zur Blutdruckregulierung im direkten Zusammenhang mit der körperlichen Betätigung und der aufrechten Körperhaltung steht und noch 15 Minuten nach dieser im Blut nachweisbar ist. Der Abfall unter Ausgangsniveau (Basalwert) hinab lässt sich womöglich durch die liegende Ruheposition und die gesunkenen Stresswerte erklären. Dafür spricht auch der Abfall des „Stresshormons“ Kortisol. Dabei kam es zu einer signifikanten Erniedrigung der Konzentrationen im Anschluss an die körperliche Betätigung. Dies betraf sowohl den 15 Minuten Wert, als auch den 120 Minuten Wert. Diese Ergebnisse sind schlüssig, wenn man bedenkt, dass die Probanden aus ihrem Alltag heraus direkt an dieser klinischen Studie teilnahmen. Das würde den anfänglich höheren Kortisol-Spiegel erklären. Die zweistündige Ruhephase im Anschluss sorgte dann im Anschluss wohlmöglich für die Erniedrigung von Kortisol. Einen direkten Anstieg von Kortisol durch die Belastung konnten wir mit unserem Studienmodell nicht nachweisen. Es kann sein, dass es zu diesem schon während der Belastung gekommen ist, 15 Minuten nach der Belastung aber nicht mehr nachweisbar war.

4.2.2 Blutentnahme

Die Blutentnahmen erfolgten zu drei Zeitpunkten: vor (t_0), 15 Minuten nach (t_1) und 120 Minuten nach (t_2) der Belastung. Nach der Abnahme wurden die Blutproben aufrecht in einem passenden Probenständer aufbewahrt, zentrifugiert, das Serum aliquotiert und in einem -80°C -Schrank eingefroren. Bei der Ausführung gab es jedoch zum Teil logistische Schwierigkeiten, sodass die Zeit zwischen den einzelnen Schritten von Probe zu Probe deutliche Unterschiede aufwies. Dabei kam es teilweise zu Liegedauern von mehreren Stunden, was Einfluss auf die Konzentrationen von einigen Biomarkern genommen haben könnte.

4.3 Biomarker in Ruhe

Um die Frage zu klären, ob das Ausmaß der basalen Sekretion der Myokine von anthropometrischen Faktoren, sowie Werten des Trainingszustands und der Bioimpedanzanalyse beeinflusst werden, wurde die Spearman Korrelation auf alle Basalwerte der Biomarker mit den besagten Werten durchgeführt. Von den erhobenen Werten ordneten wir die subjektiven Angaben zum Freizeitsportverhalten, die Ruheherzfrequenz, die Angaben zur Borg-Skala, sowie die maximale Herzfrequenz dem Trainingszustand zu. Ein guter Trainingszustand führt zu einer niedrigen Herzfrequenz in Ruhe und zu einer niedrigeren maximalen Herzfrequenz unter Belastung.

Für Myostatin ließ sich eine negative Korrelation ($r_s = -0,397$; $p = 0,022$) mit der absoluten Skelettmuskelmasse finden. Das deckt sich auch mit der bestehenden Studienlage. [82] Diese Korrelation fand sich allerdings nicht bei der absoluten und relativen Muskelmasse.

Bei Follistatin fanden sich keine direkten Korrelationen. Follistatin-like-3 hingegen zeigte deutliche Korrelation zu Werten, die auf den Trainingszustand hinweisen. Zwar fand sich keine Korrelation zum Ausmaß an Freizeitsportaktivität, dafür aber Korrelationen zur kardiovaskulären Werten. Eine niedrige Herzfrequenz korrelierte mit niedrigen Konzentrationen von FSTL3 in Ruhe ($r_s = 0,506$, $p < 0,01$). Gegeben, dass FSTL3 in grundlagenwissenschaftlichen Studien mit der endothelialen Funktion in Verbindung gebracht wurde, könnte diese Zuordnung vor allem im Vergleich mit FST von Bedeutung sein, das dann eher als Marker des Metabolismus geführt werden könnte. [50]

In dieser Studie konnte eine positive Korrelation zwischen dem Basalwert von IL-6 und dem BMI gefunden werden ($r_s = 0,420$; $p = 0,041$). Dies lässt Vermutungen zu, dass dies mit einem bei übergewichtigen, bzw. adipösen Menschen generell erhöhten Inflammationslevel zusammenhängt. Diese Vermutung ließ sich allerdings nicht durch die Daten der BIA bekräftigen. Diese ergaben keine weiteren Korrelationen zwischen IL-6 und der absoluten oder relativen Fettmasse. Für die Basalwerte von IL-8 ergaben sich keine Korrelationen.

Bei den Klotho-Konzentrationen fanden sich Korrelationen mit Werten der Bioimpedanzanalyse. Dabei stellte sich eine positive Korrelation zwischen den absoluten Klotho-Konzentrationen und sowohl der absoluten ($r_s = 0,408 - 0,472; p < 0,01$), als auch der relativen Fettmasse ($r_s = 0,449 - 0,508; p < 0,01$) heraus. Passend dazu fand sich eine negative Korrelation zwischen Klotho und der relativen Fettfreien Masse ($r_s = -0,449 - -0,508; p < 0,01$), sowie der relativen Muskelmasse ($r_s = -0,453 - -0,512, p < 0,01$). Diese Korrelationen fanden sich im ganzen Verlauf der Studie, d.h. waren zu allen Abnahmezeitpunkten nachweisbar. Das stellt die Frage auf, welche Rolle Fettgewebe in der Regulation von Klotho hat. Laut einer Studie von Fan und Sun [83] ist Klotho an der Proliferation und Differenzierung von Stammzellen des Fettgewebes beteiligt. Auf dieses Thema soll aber in dieser Arbeit nicht genauer eingegangen werden und wäre Inhalt weiterer Studien.

4.4 Biomarker nach Belastung

In der aktuellen Literatur wird der Muskel als ein endokrines Organ bezeichnet. [58] Der Muskel reagiere auf körperliche Belastung mit einer Ausschüttung einer großen Anzahl von Myokinen. Von dieser Annahme ausgehend, suchte man mit dieser Arbeit nach einer Änderung in den Myokinkonzentrationen, ausgelöst durch eine kurze sportliche Betätigung auf einem Fahrradergometer.

Diese konnte man allerdings in dieser Studie bei keinem der betrachteten Zyto-, bzw. Myokine (MSTN, FST, FSTL3, IL-6, IL-8, Klotho) nachweisen. Dies lässt Zweifel aufkommen, ob der Muskel als solches tatsächlich die Fähigkeit besitzt, innerhalb des Beobachtungszeitraums von 2 Stunden auf einen relativ kurzen Reiz hin mit der Ausschüttung von Myokinen zu reagieren.

Es wäre auch zu diskutieren, ob Muskelgewebe über denselben Sekretionsmechanismus verfügt wie endokrines Drüsengewebe. Eine weitere Frage wäre, von welchen Faktoren die Sekretion dieser Myokine abhängig ist.

4.4.1 Funktionsweise klassischen endokrinen Gewebes

Eine Grundeigenschaft von endokrinem Gewebe ist die schnelle Reaktion auf einen entsprechenden Reiz. Diese schnelle Reaktion beruht, je nach Hormongruppe, auf unterschiedlichen Mechanismen.

Peptidhormone und biogene Amine werden nach der Synthese in Speichergranula innerhalb der Zelle gespeichert und bei Bedarf durch Exozytose in die Blutbahn abgegeben. Einen Sonderfall stellen Schilddrüsenhormone dar, da diese in extrazellulären Follikeln als sog. Kolloid gespeichert werden und bei Bedarf wieder in die Zelle aufgenommen und in die Blutbahn abgegeben werden.

Steroidhormone hingegen besitzen lipophile Eigenschaften, sind membrangängig und können dementsprechend nicht in Speichergranula gelagert werden. In steroidhormonproduzierende Zellen (wie z.B. in der Nebennierenrinde) wird die Ausgangssubstanz (Cholesterin) in Lipidtröpfchen gespeichert um daraus bei Bedarf

schnell die entsprechenden Hormone zu synthetisieren. Dementsprechend sind diese Zellen (v.a. Nebennierenrinde) mit einer ausreichenden Anzahl der dafür notwendigen Zellorganellen und Enzymen ausgestattet. [2, 84] Genau das war an den in dieser Studie erhobenen Werten für Aldosteron abzulesen. Dessen Synthese und Freisetzung ging so schnell von statten, dass 15 Minuten nach der Belastung eine erhöhte Konzentration im Blut nachweisbar war.

4.4.2 Endokrine Funktionsweise des Muskelgewebes

Bei denen von uns betrachteten Myokinen handelt es sich um Proteine. Ihr Sekretionsverhalten müsste sich dementsprechend dem der Peptidhormone ähneln. Damit es dann zu einer ähnlich schnellen Ausschüttungsreaktion wie im hormonellen System kommt, wäre die Anwesenheit von präformierten sekretorischen Vesikeln im Muskelgewebe von Nöten. Die Exozytose dieser schon existierenden, Myokin-enthaltenden Vesikel könnte man als primäre Antwort bezeichnen. Existiert kein bestehendes Myokin-Depot in der Zelle, erfordert die Reaktion des Muskelgewebes eine Neusynthese der Myokine. Da es sich bei den Myokinen um Proteine handelt, muss folglich erst die Transkription der entsprechenden Genabschnitte im Zellkern, der Transport der mRNA zu den entsprechenden Zellorganellen und die anschließende Synthese der Proteine erfolgen. Diesen Vorgang könnte man als sekundäre Antwort bezeichnen. Diese Neusynthese benötigt allerdings eine gewisse Zeit.

Generell gibt es in der Zellbiologie mehrere Wege der Sekretion von Kleinmolekülen, Polypeptiden oder miRNA durch eine Zelle. Kleinmoleküle können durch entsprechende Kanäle die Zelle verlassen und dieser Vorgang ist auch einer Regulation durch z.B. liganden-operierte Kanäle zugänglich. Polypeptide müssen in der Regel eine sekretorische Sequenz enthalten, damit sie die Zelle auf dem Weg der so genannten konstitutiven Sekretion (constitutive secretory pathway) verlassen können. Zellen können aber auch Fracht („cargo“) in Vesikel verpacken und diese nach außen abgeben, so dass die Sekretion nicht unbedingt ein sekretorisches Signalpeptid benötigt. Vesikel wiederum können einerseits der regulierten Sekretion (regulated secretory pathway)

zugeordnet werden, dies würde einer endokrinen Regulation entsprechen, andererseits aber auch der nicht endokrin regulierten Freisetzung. Den Unterschied macht das Vorhandensein komplexer Sortierungs-Mechanismen aus, die man für die verschiedenen Wege benötigt. Definitiv konnte in Muskel- und in Knochenzellen das Vorhandensein der Komponenten des regulierten Sekretionsmechanismus nicht nachgewiesen werden. [85] In diesem Sinne sind also weder Muskel noch Knochen echte endokrine Organe. Die nicht reguliert freigesetzten Vesikel können auf zweierlei Arten entstehen. Sie können durch Rekrutierung von Cargo-Molekülen an die Zellmembran und anschließende Vesikelfreisetzung erfolgen (budding) oder aber aus Endosomen entstehen, die in multivesikulären Endosomen (multivesicular endosomes) gesammelt werden und dann durch Membranfusion als Exosomen aus der Zelle geschleust werden.

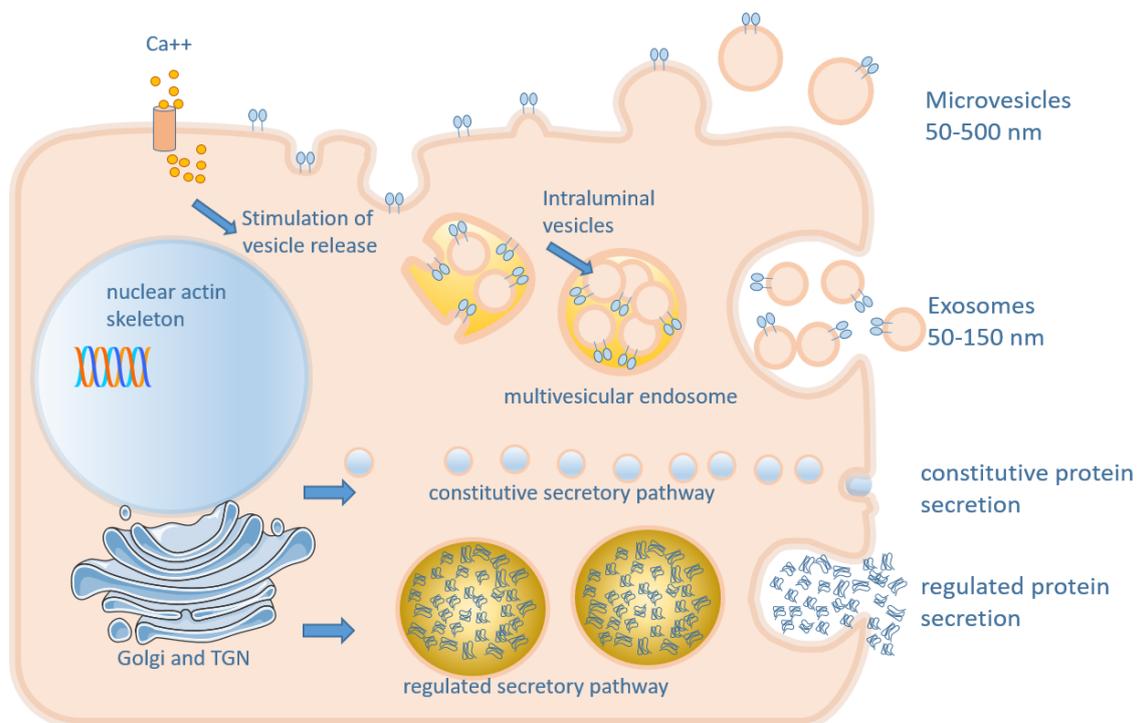


Abbildung 15 Sekretionsmechanismen

Abbildung freundlicherweise bereitgestellt durch Prof. Dr. med. F. Jakob, Uni Würzburg

Was die Regulierbarkeit der Freisetzung der Mikrovesikel und der Exosomen angeht, so besteht eine Hypothese darin, dass Kalzium-Einfluss in die Zelle den Mechanismus der Freisetzung triggern kann. Diese Form der Freisetzung käme als adäquater Reiz der Freisetzung durch körperliche Betätigung in Frage, bleibt aber dennoch zu beweisen.

Demgemäß bräuchte es zwei Voraussetzungen um eine trainingsinduzierte Freisetzung zu bewirken. Es müssten ausreichend viele Mikrovesikel für das Budding in kürzester Zeit gebildet werden oder aber genügend präformierte Vesikel in multivesikulären Endosomen verpackt vorliegen, die dann aus der Zelle auch akut ausgeschleust werden könnten. Für den letzteren Weg könnte sprechen, dass man immunreaktive Vesikel für IL6 in der Zelle identifiziert hat, die nach einer körperlichen Belastung depletiert gefunden wurden. [86] Somit konnten nach aktuellem Wissenstand wurden präformierte Vesikel und damit die Fähigkeit einer primären, schnellen Antwort, nur für Interleukin 6 nachgewiesen werden. [87] Dessen Sekretionsverhalten lässt sich aber nicht zwangsläufig auf das anderer Myokine übertragen. Sind keine präformierten Vesikel vorhanden, bleibt für diese Myokine nur der Weg der sekundären Antwort und das Einfüttern in den Pfad der konstitutiven Sekretion, was einer langfristig tonischen Antwort auf wiederholte Trainingsreize entsprechen würde. Das würde bedeuten, dass man die Wirkung von Training auf den Konzentrationsspiegel der Myokine erst nach ihrer Neusynthese und Ausschüttung im Blut nachweisen kann. So eine Proteinneusynthese dauert in etwa 4 Stunden und mehr. Das wäre auch eine Erklärung dafür, warum in dieser Arbeit keine Veränderung der Myokin-Konzentrationen innerhalb des Beobachtungszeitraums nach Belastung nachweisbar waren.

4.4.3 Einzelne Biomarker

Die einzelnen Biomarker werden von unterschiedlichen Faktoren beeinflusst. Auf diese wird in diesem Kapitel genauer eingegangen.

4.4.3.1 MSTN/ FST/ FSTL3

Myostatin hat als negativer Regulator für die Muskelmasse eine Art Sonderrolle unter den betrachteten Myokinen. Um einen positiven Effekt auf die Muskelmasse zu haben, müsste dementsprechend die Myostatin-Konzentration sinken, bzw. Myostatin inaktiviert werden. Dieser Abfall der MSTN-Konzentration als Reaktion auf ein körperliches Training konnte auch schon in verschiedenen Studien nachgewiesen

werden. Diese Studien unterschieden sich aber deutlich in verschiedenen Kategorien von der vorliegenden Arbeit.

Zum einen gab es Unterschiede, was das Ausmaß des körperlichen Trainings anging. Häufig wurde der Einfluss eines mehrwöchigen Trainingsprogramms untersucht und nicht, wie in unserer Studie, die Reaktion auf eine kurze einmalige Belastung. Zum anderen unterschied sich die Art der Gewebeprobe. Viele Studien beschäftigten sich nur mit der Genexpression von MSTN im Muskelgewebe, bestimmten also die MSTN-mRNA Konzentration aus Muskelbiopsien. [22, 26, 81, 88-90] Die anderen Studien bezogen sich, wie auch unsere Studie, auf die Myostatin-Werte im Serum. [91, 92]

Es fanden sich außerdem nur sehr wenige Studien, die den Einfluss von einer kurzen, einmaligen Belastung auf den Myostatin-Serumspiegel untersuchten. *Kazemi* [91] konnte einen Abfall der Myostatin-Konzentration im Serum nach 24 Stunden nachweisen. Der früheste Nachweis von einem Myostatin-mRNA-Abfall in einer Muskelbiopsie lieferte *Schwarz et al.* [93] 45 Minuten nach der Belastung. Dies könnte bedeuten, dass eine kurze einmalige Belastung zwar zu einer Reduktion der Myostatin-Synthese führt, diese aber erst nach einer gewissen Zeit im Serum nachweisbar wäre, entsprechend einer individuellen Halbwertszeit des jeweiligen Zielproteins. Dies deckt sich mit unseren Erkenntnissen, dass es zu keiner Veränderung der Konzentrationen innerhalb von zwei Stunden nach einer körperlichen Belastung kommt.

Eine erhöhte Expression von Follistatin oder Follistatin-like-3 führt im Gegensatz zu Myostatin zu einer Erhöhung der Muskelmasse. Dieser Effekt beruht unter anderem auf der Inaktivierung von Myostatin durch Bindung an FST, bzw. FSTL3. [48, 94]

In dieser Studie konnten wir keine Anpassungsreaktion von FST oder FSTL3 nachweisen. Anderen Studien gelang es, einen Anstieg von FST nach körperlichem Training im Blut nachzuweisen. [23-25, 95] Diese Studien unterschieden sich mit der von uns durchgeführten Studie in Hinblick auf die Trainingsbelastung. Im Gegensatz zu unserer kurzen viertelstündigen Belastung dauerte diese einmalige Belastung mindestens 30 Minuten [25] bis zu 3 Stunden. [23]

Ein weiterer Grund, warum wir keine einheitliche Reaktion von FST nachweisen konnten, könnte an der Regulation des Glukosespiegels liegen. *Hansen et al.* [24, 45] beschrieben, dass FST vor allem in der Leber synthetisiert wird und seine Ausschüttung stark von der Regulation des Glukosehaushalts, insbesondere von der Insulin- und Glukagonausschüttung, abhängt. Unsere Probanden hatten zwei Stunden vor der Untersuchung nichts mehr gegessen und keine Getränke außer Wasser zu sich genommen. Der Test fand allerdings zu verschiedenen Zeitpunkten am Tag statt, sodass die Mahlzeiten vor diesen zwei Stunden sehr unterschiedlich ausgefallen sein können. Das zeigte sich auch im Basalwert des Glukosespiegels, der sich zwischen 3,36 mmol/l und 6,00 mmol/l lag. Es wäre also denkbar, dass diese Nahrungsaufnahme noch Einfluss auf die Regulation des Zuckerhaushalts und damit auf die Sekretion von FST hatte.

FSTL3 zeigte sich in unserer Studie als ein sehr konstanter Parameter. Die Veränderungen der FSTL3-Konzentration als Reaktion auf körperliches Training erwiesen sich als sehr gering und nicht signifikant. Wir hatten gehofft, mit FSTL3 einen Parameter zur Detektion von Anpassungsreaktionen zu finden, dessen Spiegel von weniger Faktoren beeinflusst wird als z.B. FST. Bisher wurde für FSTL3 auch noch keine Beeinflussung der Konzentration durch die Blutzuckerregulation beschrieben. Einige Studien konnten eine Reaktion auf eine körperliche Belastung nachweisen. [25, 89, 96] Dabei fand sich ein Anstieg von FSTL3-mRNA im Muskel nach zwei Stunden [89], aber erst nach 24 Stunden im Serum. [96] *Perakakis et al.* [25] konnten eine Erhöhung des Serumspiegels von FSTL3 direkt nach dem Training nachweisen, allerdings normalisierte sich der FSTL3-Spiegel wieder nach einer Stunde. Nicht auszuschließen wäre, dass sich die FSTL3-Konzentration innerhalb kürzester Zeit wieder normalisiert hat und schon bei unserem Messzeitpunkt 15 Minuten nach der Belastung nicht mehr nachweisbar war. Außerdem fanden *Perakakis et al.* einen Unterschied im Ausmaß der Reaktion, wenn man verschiedene Trainingsschema anwandte. Das könnte bedeuten, dass für FSTL3 zwar eine primäre, schnelle Antwort existiert, diese aber nur sehr kurz nachweisbar ist. Außerdem kommt es nach einer gewissen Zeit zur sekundären Antwort der Anpassungsreaktion. Mit unserem Studienmodell konnten wir allerdings weder die primäre, noch die sekundäre Antwort nachweisen.

Es wurde schon mehrfach beschrieben, dass eine Wirkweise von FST und FSTL3 die Inaktivierung von Myostatin ist. Dabei bindet sowohl FST, als auch FSTL3 an MSTN, was einen Wirkverlust von MSTN zur Folge hat. Man könnte vermuten, dass sich diese Beziehung auch in den Messwerten niederschlägt. Tatsächlich konnte man in dieser Arbeit keine direkten Korrelationen zwischen den absoluten Werten von Myostatin, Follistatin und Follistatin-like-3 finden. Es wäre denkbar, dass unsere durchgeführten ELISAs sowohl ungebundenes FST, FSTL3 und MSTN, als auch den FST-MSTN-Komplex, bzw. FSTL3-MSTN-Komplex nachweisen konnten. Dies wurde bisher noch nicht getestet.

Interessanterweise konnten wir eine leichte negative Korrelation ($r_s = -0,349$; $p = 0,046$) zwischen dem FST- Basalwert und der prozentualen Änderung von Myostatin zum Zeitpunkt t1 nachweisen. Zusätzlich dazu zeigten sich signifikante positive Korrelationen zwischen der prozentualen Änderung der MSTN-Konzentration zum Zeitpunkt t1 und der prozentualen Änderung der FST-Konzentrationen zum Zeitpunkt t1 ($r_s = 0,422$; $p = 0,016$), sowie zum Zeitpunkt t2 ($r_s = 0,481$; $p = 0,005$). Dies könnte bedeuten, dass die Reaktion von MSTN auf körperliches Training sowohl direkt von der FST-Konzentration, sowie von dessen Reaktion auf körperliches Training beeinflusst wird. Natürlich könnte dies auch umgekehrt der Fall sein.

4.4.3.2 IL-6/ IL-8

Interleukin 6 ist eines der am besten erforschten Myokine. Für IL-6 konnte schon mehrfach eine akute Ausschüttung als Reaktion auf körperliches Training nachgewiesen werden. Studien konnten zeigen, dass die Muskulatur Ursprung dieser Ausschüttung ist, indem die Differenz zwischen venösen und arteriellen Blut des beanspruchten Muskels untersucht wurde. [97, 98] *Lauritzen et al.* [87] konnten außerdem mit IL-6 angereicherte Vesikel im ruhenden Muskel von Mäusen nachweisen. Nach körperlicher Belastung kam es zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl dieser Vesikel. Das lässt den Rückschluss zu, dass der Muskel in der Lage ist, während einer Belastung IL-6 aus diesen präformierten sekretorischen Vesikeln auszuschütten. Dieser Vorgang geschieht

in einem solchen Ausmaß, dass man eine Erhöhung des Interleukin 6-Spiegels auch im peripheren Blut finden konnte. [27-30] In unserer Studie konnte diese Erhöhung in der Gesamtpopulation allerdings nicht nachgewiesen werden. Das könnte verschiedene Ursachen haben.

IL-6 soll einen großen Einfluss auf die Energieversorgung der arbeitenden Muskulatur haben. Darunter fällt die Regulierung der Glukoseaufnahme und des Glykogen- und Fettmetabolismus. [99-101] Eine akute Anpassung an einen bestehenden Energiemangel erfordert also eine schnelle Reaktion, was die Präsenz der präformierten sekretorischen Vesikel erklären würde. Allerdings wird die systemische Energiemobilisierung, d.h. eine Glukoseausschüttung aus der Leber, erst benötigt, wenn die Energiereserven des Muskels erschöpft sind. Das geschieht nach ca. 10-15 Minuten Belastung, wenn das im Muskel gespeicherte ATP und das Kreatininphosphat, sowie der eigene Glykogenspeicher verbraucht ist. [102, 103] Es wäre also denkbar, dass IL-6 erst beim Versiegen der muskeleigenen Energiereserven sezerniert wird. Der genaue Zeitpunkt, wann das passiert, könnte dementsprechend von verschiedenen individuellen Faktoren, wie zum Beispiel dem Status der muskeleigenen Energiereserven [104] oder dem aktuellen Blutzuckerspiegel, beeinflusst werden. Das würde auch erklären, warum wir in unserer Studie nur bei einem Teil der Probanden einen Anstieg von IL-6 beobachten konnten.

Fischer [101] konnte außerdem zeigen, dass eine trainingsinduzierte Interleukin 6 Ausschüttung stark von der Dauer, aber auch von der Intensität der Belastung abhängt. Es könnte also in unserer Studie der Fall sein, dass die kurze viertelstündige Belastung einfach nicht ausreichend war, um bei allen Probanden eine IL-6-Sekretion auszulösen.

Des Weiteren wäre denkbar, dass der Ergometertest zwar zu einer Ausschüttung von IL-6 führte, dieser aber so gering ausfiel, dass er im peripheren Blut nicht mehr nachweisbar war. Nachdem man beim Fahrradfahren v.a. die Muskulatur der unteren Extremitäten benutzt, könnte man möglicherweise eine Erhöhung der IL-6-Konzentration in den ableitenden Venen nachweisen. Bei einer Blutentnahme in der Ellenbeuge können dann kleine Sekretionsmengen nicht nachgewiesen werden.

Man kann abschließend sagen, dass unser Fahrradergometertest in seiner Form nicht in der Lage ist eine einheitliche Reaktion der IL-6-Sekretion unter unserer Studienpopulation auszulösen.

Für Interleukin 8 konnte bisher schon mehrfach eine trainingsinduzierte Ausschüttung ins Blut nachgewiesen werden. Allerdings fand sich dieser Anstieg bisher vor allem bei längerem, erschöpfendem Training. [105-108]. Moderates Training führte nicht zu einer Erhöhung des Plasma-IL-8-Spiegels, allerdings konnte eine Erhöhung der IL-8-mRNA im Muskel nachgewiesen werden. [104] Das Belastungsschema unserer Studie stellte sich im Vergleich mit bisher durchgeführten Studien kürzer und weniger intensiv dar. Das würde erklären, warum wir keine IL-8-Veränderung im Serum beobachten konnten. Ob unsere viertelstündige Belastung ausreicht hat, um eine lokale, parakrine Ausschüttung zu verursachen, konnte in dieser Studie nicht geklärt werden und bedarf weiterer Untersuchung.

4.4.3.3 Klotho

Klotho gilt als Jugendlichkeitshormon und hat ähnliche Effekte auf den Körper wie körperliches Training. Einen guten Überblick über den ähnlichen Einfluss von Klotho und körperlicher Betätigung auf beispielsweise den Knochenmineralgehalt, auf die Regenerationsfähigkeit von Gewebe oder die Angiogenese haben *Avin et al.* [31] in ihrer Arbeit gut zusammengefasst. Andere Studien konnten auch einen direkten Zusammenhang zwischen der Klotho-Konzentration im Blut und körperlicher Belastung nachweisen. [32, 109, 110] Dabei stieg der Klotho-Spiegel im Serum teilweise direkt nach einer körperlichen Belastung nachweisbar an. In unserer Studie konnte dieser Anstieg nicht nachgewiesen werden.

Dies könnte auf den unterschiedlichen Trainingszustand der Probanden zurückzuführen sein. *Avin et al.* [31] konnten die Anpassungsreaktion auf eine kurze Belastung erst nach einem 12-wöchigen Trainingsprogramm nachweisen. Vor diesem Trainingsprogramm fand sich diese Reaktion nicht. Das lässt vermuten, dass ein guter Trainingszustand zu

einer (erhöhten) Ausschüttung führt. Unsere Daten sprechen allerdings für das Gegenteil. In unserer Studie wurde der Trainingszustand mit der Erfassung des Freizeitsportverhaltens mittels MET-Minuten, bzw. MET-Stunden erfasst. Dort zeigte sich erstaunlicherweise eine negative Korrelation zwischen der Klotho-Änderung zum Zeitpunkt t1 und der Summe aller MET-Minuten ($r_s = -0,406$; $p = 0,019$). Passend dazu fand sich in unserer Studienpopulation, eine negative Korrelation der basalen Klotho-Konzentrationen und der relativen Muskelmasse. Klotho-Shedding in der Niere wird durch die Proteasen ADAM10 und 17 ausgeführt. Zumindest für die Maus mit Diabetes wurde nachgewiesen, dass körperliches Training die Aktivität dieser „Sheddasen“ hemmt und so die Freisetzung von Klotho von der Zelloberfläche vermindert. Würde man diese Phänomene auf den Menschen übertragen können, wäre damit eine Spur der Plausibilität gefunden, der man in zukünftigen Studien folgen könnte [111]

4.5 Limitationen

Bei der Betrachtung der Studie musste man einige Gesichtspunkte berücksichtigen, die Einfluss auf die Ergebnisse gehabt haben könnten. Diese werden in diesem Kapitel nochmal zusammengefasst.

4.5.1 Probandenklientel

Die Auswahl der Probanden erfolgte nicht rein zufällig, sondern aus dem Bekanntenkreis des Durchführenden. Ein Hinweis darauf, das Alter betreffend, fand sich in den anthropometrischen Daten. Sehr heterogen stellte sich die Studienpopulation im Hinblick auf den Trainingszustand dar. Das alles könnte möglicherweise auch die Konzentrationen der Zyto-, bzw. Myokine oder deren Anpassungsreaktion beeinflusst haben. Sofern dieser Punkt eine ausschlaggebende Rolle gespielt haben könnte, wird er in einer bereits laufenden Folgestudie überprüft werden können, in der ein ähnliches Kollektiv, allerdings mit einer sehr viel homogeneren Trainingsleistung, untersucht wird.

4.5.2 Studiendurchführung

Ein weiterer Faktor könnte die Nutzung eines festgelegten, einheitlichen Belastungsschemas sein. Dieses Schema führte dazu, dass dieser Test von den Probanden als unterschiedlich anstrengend empfunden wurde und es zu unterschiedlichen starken kardiovaskulären und metabolischen Anpassungsreaktionen kam. Möglicherweise kam es dadurch auch zu einer Beeinflussung der Zyto-, bzw. Myokinreaktion.

Das Blutentnahmeschema könnte auch Einfluss genommen haben. Bei unserer Studie haben wir uns für drei Blutentnahmen entschlossen. Eine fand vor, eine 15 Minuten nach und die letzte 120 Minuten nach der Belastung statt. Dadurch konnten wir keine Änderungen nachweisen, die möglicherweise direkt nach der Belastung stattfand. Auch ein Nachweis einer Belastungsreaktion im Anschluss an die zweistündige Ruhephase konnten wir mit unserem Studienmodell nicht erfassen.

Ein weiterer Gesichtspunkt wäre das Handling der Blutproben. Dabei kam es zum Teil zu deutlichen Abständen zwischen den einzelnen Bearbeitungsschritten. Außerdem ist ein Einfluss des Transports zwischen den einzelnen Einrichtungen nicht auszuschließen. Eine im Jahr 2017 durchgeführte Studie kam zum Ergebnis, dass einige Zytokine, darunter auch die von uns betrachteten Interleukine 6 und 8 durch lange Lagerungszeiten beeinträchtigt werden. [77] Dadurch könnte auch die teilweise sehr hohe Varianz der einzelnen IL-6 und IL-8-Werte erklärt werden. Ob die unterschiedlichen Lagerungszeiten in unserer Studie direkt zu einer Veränderung der Zytokin-, bzw. Myokin-Konzentrationen geführt hat, konnte man in dieser Arbeit nicht nachweisen, aber auch nicht ausschließen. Um diesen Störfaktor auszuschließen, wäre es für zukünftige Studien ratsam, eine einheitliche Lagerungsform und -dauer zu etablieren.

4.6 Ausblick

Die durchgeführte Studie galt als Startpunkt für eine größer angelegte Studienreihe, bei dem der Fahrradergometertest bei unterschiedlichen Studienpopulationen durchgeführt werden sollte. Dadurch sollen mögliche Unterschiede der Anpassungsreaktionen zwischen verschiedenen Probandengruppen untersucht werden. Diese anderen Studien beschäftigen sich mit Leistungssportlern oder älteren sarkopenen Männern.

5 Zusammenfassung

Der menschliche Körper muss sich durchgehend an äußere Einflüsse anpassen. Ganz besonders betrifft dies das muskuloskelettale System. Unter Belastung wird Knochen fester und widerstandsfähiger, im Muskel kommt es zur Größenzunahme und Kraftsteigerung. Dieser Mechanismus ist zwar vielen bekannt, allerdings bisher nicht vollständig verstanden.

In den letzten Jahren gab es immer wieder Arbeiten dazu, dass das betroffene Gewebe selbst diese Anpassungsreaktion auslöst. Denkbar wäre das unter anderem durch mechanoresponsive Elemente in den Zellen, die die auf sie wirkende Kraft registrieren und Anpassungsreaktionen auslösen können. Ein möglicher Weg zur Induktion der Anpassungsvorgänge ist die Ausschüttung von hormonell aktiven Proteinen. Diese Zytokine, bzw. Myokine (aus Muskelgewebe) führen dann im Körper unter anderem zu oben genannten Veränderungen. Die in dieser Arbeit betrachteten Zyto-, bzw. Myokine sind Myostatin, Follistatin, Follistatin-like-3, Interleukin 6, Interleukin 8 und Klotho.

Zur Detektion einer direkten Ausschüttung dieser Substanzen wurde von uns eine klinische Studie durchgeführt. Diese bestand aus einer Bioimpedanzanalyse, einem Fahrradergometertest und einer anschließenden zweistündigen Ruhephase. In dieser Zeit wurde den Probanden mehrmals Blut abgenommen. Anschließend wurde die Konzentrationen der Biomarker zu den unterschiedlichen Zeitpunkten (davor; 15min n.B.; 120min n.B.) mittels ELISA bestimmt.

Entgegen der Erwartungen konnte diese Studie keine signifikante Änderung der betrachteten Biomarker innerhalb der beobachteten Zeit nachweisen. Dies wirft Fragen bezüglich des Ausschüttungsmechanismus oder den Ausschüttungsbedingungen auf. Nach unserer Theorie hat insbesondere der Muskel nicht die Fähigkeit einer primären Antwort, d.h. einer direkten schnellen Sekretion von Myokinen als Reaktion auf einen Reiz hin, es sei denn es ließe sich nachweisen, dass der trainingsinduzierte Kalziumeinstrom in die Zelle ein adäquater Reiz für die Sekretion extrazellulärer Vesikel ist, die mit einer entsprechenden Fracht (cargo) beladen sind. Für miRNAs ist dies einer der zukunftsreichsten Wege, Rückschlüsse auf den belasteten Muskel und vielleicht

auch den Trainingszustand zu ziehen. Eine sehr große Bedeutung könnte der sekundären Antwort zukommen, d.h. einer veränderten Syntheseaktivität, die zu einer erhöhten tonischen Sekretion nach Neusynthese der Myokine führt. Eine Erhöhung deren Konzentrationen im Blut wäre dementsprechend erst nach einer gewissen Zeit nachzuweisen. Wahrscheinlich kam es bei unseren Probanden zu dieser Erhöhung nach dem Beobachtungszeitraum von zwei Stunden.

Die durchgeführte Studie gilt als Startpunkt für eine größer angelegte Studienreihe, bei dem der Fahrradergometertest bei unterschiedlichen Studienpopulationen durchgeführt werden sollte. Dadurch sollen mögliche Unterschiede der Anpassungsreaktionen zwischen verschiedenen Probandengruppen untersucht werden. Diese anderen Studien beschäftigen sich zunächst mit Leistungssportlern oder älteren sarkopenen Männern.

6 Verzeichnisse

6.1 Abkürzungsverzeichnis

A

abs	absolut
AMP	Adenosinmonophosphat
ASMM	appendikuläre skeletale Muskelmasse
ASMI	appendikulärer skeletaler Muskelmassen-Index
ATP	Adenosintriphosphat

B

BCM	engl. body cell mass/ dt. Körpermasse
BCMI	Körpermassenindex
BMI	<i>engl.</i> Body Mass Index

D

DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHEAS	Dehydroepiandrosteron-Sulfat
DIA	diastolischer Blutdruck

E

ECW	Extrazelluläres Wasser
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	<i>engl.</i> Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

F

FFM	Fettfreie Masse
FFMI	Fettfreie Massen- Index
FM	Fettmasse
FMI	Fettmassen-Index
FST	Follistatin
FSTL3	Follistatin-like-3

G

GPAQ *engl.* Global Physical Activity Questionnaire

H

h *engl.* hour(s)/ *dt.* Stunde(n)

HF Herzfrequenz

I

IL-6 Interleukin 6

IL-8 Interleukin 8

IQA Interquartilsabstand

K

KL Klotho

L

Lac Lactat

M

M Mittelwert

MAD Mittlerer arterieller Druck

Max Maximum

Mdn Median

MET Metabolisches Äquivalent

Min Minimum

MM Muskelmasse

MMI Muskelmassen-Index

mRNA *engl.* messenger ribonucleic acid/ *dt.* Boten- Ribonukleinsäure

MSTN Myostatin

N

N Anzahl

n.B. nach Belastung

n.s. nicht signifikant

O

OZMF Orthopädisches Zentrum für Muskuloskelettale Forschung

P

PhA engl. phase angle/ dt. Phasenwinkel

R

rel relativ

RR Blutdruck

RR_{DIA} Diastolischer Blutdruck

RR_{SYS} Systolischer Blutdruck

S

S/min Schläge pro Minute (Herzfrequenz)

SD engl. standard deviation/ dt. Standardabweichung

SMM Skelettmuskelmasse

SMI Skelettmuskel-Index

sO₂ Sauerstoffsättigung

T

TBW engl. total body water/ dt. Gesamtkörperwasser

U

U/min Umdrehungen pro Minute

V

VO₂max maximale Sauerstoffaufnahme

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Belgian Blue Cattle:.....	13
Abbildung 2 Steroidhormon-Biosynthese in der Nebennierenrinde.....	18
Abbildung 3 Belastungsschema Ergometertest.....	28
Abbildung 4 Messbereich Sandwich ELISA	34
Abbildung 5 Funktionsweise Sandwich-ELISA.....	35
Abbildung 6 Blutdruck (A) und Herzfrequenz (B) im Verlauf.....	43
Abbildung 7 Verlauf der absoluten Aldosteron-Konzentrationen (A) und Änderung der Aldo-Konzentration bezogen auf den t0-Wert (B)	44
Abbildung 8 Verlauf der absoluten Kortisol-Konzentrationen (A) und Änderung der Kortisol-Konzentration bezogen auf den t0-Wert (B)	45
Abbildung 9 Verlauf der absoluten MSTN-Konzentrationen (A) und Änderung der MSTN-Konzentration bezogen auf den t0-Wert (B).....	48
Abbildung 10 Verlauf der absoluten FST-Konzentrationen (A) und Änderung der FST-Konzentration bezogen auf den t0-Wert (B).....	49
Abbildung 11 Verlauf der absoluten FSTL3-Konzentrationen (A) und Änderung der FSTL3-Konzentration bezogen auf den t0-Wert (B)	50
Abbildung 12 Verlauf der absoluten IL-6-Konzentrationen (A) und Änderung der IL-6-Konzentration bezogen auf den t0-Wert (B).....	51
Abbildung 13 Verlauf der absoluten IL-8-Konzentrationen (A) und Änderung der IL-8-Konzentration bezogen auf den t0-Wert (B).....	52
Abbildung 14 Verlauf der absoluten Klotho-Konzentrationen (A) und Änderung der Klotho-Konzentration bezogen auf den t0-Wert (B)	53
Abbildung 15 Sekretionsmechanismen	70

Tabelle 1 Bisherige Studien zur Zytokin/Myokin-Ausschüttung nach körperlichem Training.....	12
Tabelle 2 Gewichtsklassifikation bei Erwachsenen.....	26
Tabelle 3 Durchführung Fahrradergometertest	28
Tabelle 4 Charakteristika der Probanden.....	39
Tabelle 5 BMI Gruppeneinteilung	39
Tabelle 6 Ergebnis Bioimpedanzanalyse	40
Tabelle 7 Korrelationen zwischen Myostatin und BIA	54
Tabelle 8 Korrelationen FST	55
Tabelle 9 Korrelationen FSTL3.....	55
Tabelle 10 Korrelationen MSTN zu anderen Myokinen	56
Tabelle 11 Korrelationen FST zu anderen Myokinen	56
Tabelle 12 Korrelationen FSTL3 zu anderen Myokinen	57
Tabelle 13 Korrelationen von IL-6	57
Tabelle 14 Korrelationen von IL-8	58
Tabelle 15 Korrelationen von Klotho	60
Anhang 1 Versuchsaufbau	Anhang
Anhang 2 Ausschlusskriterien	Anhang
Anhang 3 Abbruchkriterien	Anhang

6.3 Literaturverzeichnis

1. Luttmann, W., et al., *Quantitative Immunoassays*, in *Der Experimentator: Immunologie*. 2014, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 103-131.
2. Lüllmann-Rauch, R., *Taschenlehrbuch Histologie*. 4 ed. 2012, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
3. Welsch, U., *Lehrbuch Histologie*. 4. Auflage ed. 2014.
4. Behrends, J., et al., *Physiologie*. 3 ed. Duale Reihe. 2017, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
5. Sakuma, K., W. Aoi, and A. Yamaguchi, *Molecular mechanism of sarcopenia and cachexia: recent research advances*. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 2017: p. 1-19.
6. W., H. and S.H. K., *Sportmedizin - Grundlagen für körperliche Aktivität, Training und Präventivmedizin*. 5 ed. 2009, Stuttgart: Schattauer GmbH.
7. Iizuka, K., T. Machida, and M. Hirafuji, *Skeletal Muscle Is an Endocrine Organ*. *Journal of Pharmacological Sciences*, 2014. **125**(2): p. 125-131.
8. Tittel, K. and E.J. Seidel, *Beschreibende und funktionelle Anatomie*. 15 ed. 2012, München: Kiener.
9. Weineck, J., *Sportbiologie*. 10 ed. 2010, Balingen: Spitta Verlag GmbH & Co. KG.
10. Costill, D.L., W.J. Fink, and M.L. Pollock, *Muscle fiber composition and enzyme activities of elite distance runners*. *Med Sci Sports*, 1976. **8**(2): p. 96-100.
11. Chul-Gyun, L., J. Jiyoung, and K. Chung, *Cellular machinery for sensing mechanical force*. *BMB Rep.*, 2018. **51**(12): p. 623-629.
12. Ziouti, F., et al., *NOTCH Signaling Is Activated through Mechanical Strain in Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells*. *Stem Cells Int*, 2019. **2019**: p. 5150634.
13. Weinbaum, S., et al., *An Integrative Review of Mechanotransduction in Endothelial, Epithelial (Renal) and Dendritic Cells (Osteocytes)*. *Cell Mol Bioeng*, 2011. **4**(4): p. 510-537.
14. Duffy, M.P. and C.R. Jacobs, *Seeing the unseen: cell strain and mechanosensing*. *Biophys J*, 2015. **108**(7): p. 1583-1584.
15. Wackerhage, H., M. Hofmann, and B. Wessner, *Muskelapparat*, in *Molekulare Sport- und Leistungsphysiologie: Molekulare, zellbiologische und genetische Aspekte der körperlichen Leistungsfähigkeit*, N. Bachl, et al., Editors. 2018, Springer Vienna: Vienna. p. 105-128.
16. Salvi, A.M. and K.A. DeMali, *Mechanisms linking mechanotransduction and cell metabolism*. *Curr Opin Cell Biol*, 2018. **54**: p. 114-120.
17. Wolff, J., *Das Gesetz der Transformation der Knochen*. 1892: Verlag von August Hirschwald.
18. Grifka, J. and J. Krämer, *Orthopädie Unfallchirurgie*. 9 ed. 2013, Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.
19. Hemmatian, H., et al., *Aging, Osteocytes, and Mechanotransduction*. *Curr Osteoporos Rep*, 2017. **15**(5): p. 401-411.
20. Ferrari, G., et al., *Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors*. *Science*, 1998. **279**(5356): p. 1528-30.
21. Steinacker, J.M., et al., *Strukturanpassungen des Skelettmuskels auf Training*. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*, 2002. **Jahrgang 53, Nr. 12**: p. 354-360.

22. Snijders, T., et al., *Acute dietary protein intake restriction is associated with changes in myostatin expression after a single bout of resistance exercise in healthy young men*. J Nutr, 2014. **144**(2): p. 137-45.
23. Hansen, J., et al., *Exercise induces a marked increase in plasma follistatin: evidence that follistatin is a contraction-induced hepatokine*. Endocrinology, 2011. **152**(1): p. 164-71.
24. Hansen, J.S., et al., *Exercise-Induced Secretion of FGF21 and Follistatin Are Blocked by Pancreatic Clamp and Impaired in Type 2 Diabetes*. J Clin Endocrinol Metab, 2016. **101**(7): p. 2816-25.
25. Perakakis, N., et al., *Physiology of Activins/Follistatins: Associations With Metabolic and Anthropometric Variables and Response to Exercise*. J Clin Endocrinol Metab, 2018. **103**(10): p. 3890-3899.
26. Louis, E., et al., *Time course of proteolytic, cytokine, and myostatin gene expression after acute exercise in human skeletal muscle*. J Appl Physiol (1985), 2007. **103**(5): p. 1744-51.
27. Schmidt, A., et al., *Short intensive exercise increases the migratory activity of mesenchymal stem cells*. British Journal of Sports Medicine, 2009. **43**(3): p. 195.
28. Philippe, M., et al., *Acute effects of concentric and eccentric exercise on glucose metabolism and interleukin-6 concentration in healthy males*. Biol Sport, 2016. **33**(2): p. 153-8.
29. Omoto, M., et al., *Cycling Exercise with Electrical Stimulation of Antagonist Muscles Increases Plasma Growth Hormone and IL-6*. Tohoku J Exp Med, 2015. **237**(3): p. 209-17.
30. Paulson, T.A., et al., *Plasma cytokine and exertional responses in relation to exercise intensity and volume of exercising muscle mass during arm-crank ergometry*. Appl Physiol Nutr Metab, 2015. **40**(8): p. 782-7.
31. Avin, K.G., et al., *Skeletal muscle as a regulator of the longevity protein, Klotho*. Front Physiol, 2014. **5**: p. 189.
32. Santos-Dias, A., et al., *Longevity protein klotho is induced by a single bout of exercise*. Br J Sports Med, 2016.
33. McPherron, A.C. and S.-J. Lee, *Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene*. 1997. **94**(23): p. 12457-12461.
34. Bachl, N., C. Lorenz, and G. Geoffrey, *Wachstumsfaktoren unter besonderer Berücksichtigung des muskuloskelettalen Systems*, in *Molekulare Sport- und Leistungsphysiologie: Molekulare, zellbiologische und genetische Aspekte der körperlichen Leistungsfähigkeit*, N. Bachl, et al., Editors. 2018, Springer Vienna: Vienna. p. 171-228.
35. Welle, S., et al., *Muscle growth after postdevelopmental myostatin gene knockout*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **292**(4): p. E985-91.
36. Schuelke, M., et al., *Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child*. N Engl J Med, 2004. **350**(26): p. 2682-8.
37. Stoolhog, Koe van Belgisch blauwe ras, B. blauwe.jpeg, Editor. 2008.
38. Suryawan, A., et al., *Expression of the TGF-beta family of ligands is developmentally regulated in skeletal muscle of neonatal rats*. Pediatr Res, 2006. **59**(2): p. 175-9.
39. Roth, S.M., et al., *Myostatin gene expression is reduced in humans with heavy-resistance strength training: a brief communication*. Exp Biol Med (Maywood), 2003. **228**(6): p. 706-9.
40. Kirk, S., et al., *Myostatin regulation during skeletal muscle regeneration*. J Cell Physiol, 2000. **184**(3): p. 356-63.
41. Hamrick, M.W., *Increased bone mineral density in the femora of GDF8 knockout mice*. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol, 2003. **272**(1): p. 388-91.

42. Hamrick, M.W., C. Pennington, and C.D. Byron, *Bone architecture and disc degeneration in the lumbar spine of mice lacking GDF-8 (myostatin)*. J Orthop Res, 2003. **21**(6): p. 1025-32.
43. Gonzalez-Cadavid, N.F. and S. Bhasin, *Role of myostatin in metabolism*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2004. **7**(4): p. 451-7.
44. Ueno, N., et al., *Isolation and partial characterization of follistatin: a single-chain Mr 35,000 monomeric protein that inhibits the release of follicle-stimulating hormone*. 1987. **84**(23): p. 8282-8286.
45. Hansen, J.S., et al., *Circulating Follistatin Is Liver-Derived and Regulated by the Glucagon-to-Insulin Ratio*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2016. **101**(2): p. 550-560.
46. Amthor, H., et al., *Follistatin complexes Myostatin and antagonises Myostatin-mediated inhibition of myogenesis*. Developmental Biology, 2004. **270**(1): p. 19-30.
47. Lee, S.-J. and A.C. McPherron, *Regulation of myostatin activity and muscle growth*. 2001. **98**(16): p. 9306-9311.
48. Lee, S.J., et al., *Regulation of muscle mass by follistatin and activins*. Mol Endocrinol, 2010. **24**(10): p. 1998-2008.
49. NCBI. *FSTL3 follistatin like 3 [Homo sapiens (human)]*. 2019 12.09.19 29.11.19]; Available from: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=\(fstl3\[gene\]\)%20AND%20\(Homo%20sapiens\[orgn\]\)%20AND%20alive\[prop\]%20NOT%20newentry\[gene\]&sort=weight#gene-expression](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=(fstl3[gene])%20AND%20(Homo%20sapiens[orgn])%20AND%20alive[prop]%20NOT%20newentry[gene]&sort=weight#gene-expression).
50. Kelaini, S., et al., *Follistatin-Like 3 Enhances the Function of Endothelial Cells Derived from Pluripotent Stem Cells by Facilitating beta-Catenin Nuclear Translocation Through Inhibition of Glycogen Synthase Kinase-3beta Activity*. Stem Cells, 2018. **36**(7): p. 1033-1044.
51. Haidet, A.M., et al., *Long-term enhancement of skeletal muscle mass and strength by single gene administration of myostatin inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(11): p. 4318-22.
52. Hill, J.J., et al., *The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum*. J Biol Chem, 2002. **277**(43): p. 40735-41.
53. Larsen, M. and S. Agarwal, *FSTL3 Mediates Exercise Driven Bone Formation*. Plast Reconstr Surg, 2015. **136**(4 Suppl): p. 158.
54. Nam, J., et al., *Follistatin-like 3 is a mediator of exercise-driven bone formation and strengthening*. Bone, 2015. **78**: p. 62-70.
55. Bruder, D. and R. Dörries, *Mechanismen der angeborenen und der erworbenen Immunabwehr*, in *Duale Reihe Medizinische Mikrobiologie*, H. Hof, D. Schlüter, and R. Dörries, Editors. 2019, Georg Thieme Verlag.
56. Ostrowski, K., et al., *A trauma-like elevation of plasma cytokines in humans in response to treadmill running*. J Physiol, 1998. **513** (Pt 3): p. 889-94.
57. Knudsen, J.G., et al., *Skeletal muscle IL-6 and regulation of liver metabolism during high-fat diet and exercise training*. 2016. **4**(9): p. e12788.
58. Pedersen, B.K. and M.A. Febbraio, *Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6*. Physiol Rev, 2008. **88**(4): p. 1379-406.
59. Kuro-o, M., et al., *Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing*. Nature, 1997. **390**(6655): p. 45-51.
60. Amaro-Gahete, F.J., et al., *Role of Exercise on S-Klotho Protein Regulation: A Systematic Review*. Curr Aging Sci, 2018. **11**(2): p. 100-107.
61. Kurosu, H., et al., *Suppression of aging in mice by the hormone Klotho*. Science, 2005. **309**(5742): p. 1829-33.

62. Kuro-o, M., *Klotho and the Aging Process*. Korean J Intern Med, 2011. **26**(2): p. 113-122.
63. Matsubara, T., et al., *Aerobic exercise training increases plasma Klotho levels and reduces arterial stiffness in postmenopausal women*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2014. **306**(3): p. H348-55.
64. Mostafidi, E., et al., *Serum Klotho Levels in Trained Athletes*. Nephrourol Mon, 2016. **8**(1): p. e30245.
65. Deutzmann, R., *Hormone der Nebennierenrinde*, in *Duale Reihe Physiologie*, J. Behrends, et al., Editors. 2016, Georg Thieme Verlag.
66. Mannix, E.T., et al., *Atrial natriuretic peptide and the renin-aldosterone axis during exercise in man*. Med Sci Sports Exerc, 1990. **22**(6): p. 785-9.
67. Roth, E., K. Flich, and J. Huber, *Endokrines System*, in *Molekulare Sport- und Leistungsphysiologie: Molekulare, zellbiologische und genetische Aspekte der körperlichen Leistungsfähigkeit*, N. Bachl, et al., Editors. 2018, Springer Vienna: Vienna. p. 229-264.
68. Deutzmann, R., *Hormone der Nebennierenrinde*, in *Duale Reihe Physiologie*, J. Behrends, et al., Editors. 2012, Thieme.
69. Department, P.o.N.D. and W.H. Organization *Global Physical Activity Questionnaire*.
70. Department, P.o.N.D. and W.H. Organization *GPAQ Analysis Guide*.
71. Larsen, R., *Anästhesie und Intensivmedizin in Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie*. 1999, Berlin [u.a.]: Springer. XVII, 547 S.
72. *Obesity: preventin and managing the global epidemic*, in *WHO Technical Report Series*. 2000, WHO: Genf.
73. KG, S.m.G.C. *Klebeelektroden für die BIA-Messung*. 24.07.2019]; Available from: <https://www.smt-medical.com/produkte/akern-bioimpedanzanalysegeraete/bia-elektroden.html>.
74. Burkholder, T.J., *Mechanotransduction in skeletal muscle*. Front Biosci., 2008. **12**: p. 174-191.
75. Lollgen, H. and D. Leyk, *Exercise Testing in Sports Medicine*. Dtsch Arztebl Int, 2018. **115**(24): p. 409-416.
76. BORG, G.A.V., *Psychophysical bases of perceived exertion*. 1982. **14**(5): p. 377-381.
77. Rehm, H. and T. Letzel, *Antikörper und Aptamere*, in *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. 2016, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 199-231.
78. Kyle, U.G., et al., *Fat-free and fat mass percentiles in 5225 healthy subjects aged 15 to 98 years*. Nutrition, 2001. **17**(7-8): p. 534-41.
79. Bahadori, B., et al. *Body composition: the fat-free mass index (FFMI) and the body fat mass index (BFMI) distribution among the adult Austrian population - results of a cross-sectional pilot study*
80. He, Z., et al., *Myokine Response to High-Intensity Interval vs. Resistance Exercise: An Individual Approach*. Frontiers in physiology, 2018. **9**: p. 1735-1735.
81. Covington, J.D., et al., *Myokine Expression in Muscle and Myotubes in Response to Exercise Stimulation*. Med Sci Sports Exerc, 2016. **48**(3): p. 384-90.
82. Yarasheski, K.E., et al., *Serum myostatin-immunoreactive protein is increased in 60-92 year old women and men with muscle wasting*. J Nutr Health Aging, 2002. **6**(5): p. 343-8.
83. Fan, J. and Z. Sun, *The Antiaging Gene Klotho Regulates Proliferation and Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells*. Stem cells (Dayton, Ohio), 2016. **34**(6): p. 1615-1625.
84. Ulfing, N., *Einführung*, in *Kurzlehrbuch Histologie*, N. Ulfing, Editor. 2015, Georg Thieme Verlag.

85. Le Bihan, M.-C., et al., *In-depth analysis of the secretome identifies three major independent secretory pathways in differentiating human myoblasts*. Journal of Proteomics, 2012. **77**: p. 344-356.
86. Annibalini, G., et al., *Muscle and Systemic Molecular Responses to a Single Flywheel Based Iso-Inertial Training Session in Resistance-Trained Men*. Front Physiol, 2019. **10**: p. 554.
87. Lauritzen, H.P.M.M., et al., *Contraction and AICAR Stimulate IL-6 Vesicle Depletion From Skeletal Muscle Fibers In Vivo*. Diabetes, 2013. **62**(9): p. 3081.
88. Pugh, J.K., et al., *Acute molecular responses to concurrent resistance and high-intensity interval exercise in untrained skeletal muscle*. Physiol Rep, 2015. **3**(4).
89. Roschel, H., et al., *Effect of eccentric action velocity on expression of genes related to myostatin signaling pathway in human skeletal muscle*. Biology of sport, 2018. **35**(2): p. 111-119.
90. Hulmi, J.J., et al., *Resistance exercise with whey protein ingestion affects mTOR signaling pathway and myostatin in men*. J Appl Physiol (1985), 2009. **106**(5): p. 1720-9.
91. Kazemi, F., *The correlation of resistance exercise-induced myostatin with insulin resistance and plasma cytokines in healthy young men*. J Endocrinol Invest, 2016. **39**(4): p. 383-8.
92. Hittel, D.S., et al., *Myostatin decreases with aerobic exercise and associates with insulin resistance*. Med Sci Sports Exerc, 2010. **42**(11): p. 2023-9.
93. Schwarz, N.A., et al., *Effect of resistance exercise intensity on the expression of PGC-1alpha isoforms and the anabolic and catabolic signaling mediators, IGF-1 and myostatin, in human skeletal muscle*. Appl Physiol Nutr Metab, 2016. **41**(8): p. 856-63.
94. Gilson, H., et al., *Follistatin induces muscle hypertrophy through satellite cell proliferation and inhibition of both myostatin and activin*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. **297**(1): p. E157-64.
95. Willis, S.A., et al., *Effect of exercise intensity on circulating hepatokine concentrations in healthy men*. Appl Physiol Nutr Metab, 2019: p. 1-8.
96. Willoughby, D.S. and L. Taylor, *Effects of concentric and eccentric muscle actions on serum myostatin and follistatin-like related gene levels*. J Sports Sci Med, 2004. **3**(4): p. 226-33.
97. Steensberg, A., et al., *IL-6 and TNF-alpha expression in, and release from, contracting human skeletal muscle*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002. **283**(6): p. E1272-8.
98. Steensberg, A., et al., *Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6*. J Physiol, 2000. **529 Pt 1**: p. 237-42.
99. Keller, C., et al., *Transcriptional activation of the IL-6 gene in human contracting skeletal muscle: influence of muscle glycogen content*. FASEB J, 2001. **15**(14): p. 2748-50.
100. Carey, A.L., et al., *Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase*. Diabetes, 2006. **55**(10): p. 2688-97.
101. Fischer, C.P., *Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance?* Exerc Immunol Rev, 2006. **12**: p. 6-33.
102. Grissmer, S., *Arbeits-, Sport- und Leistungsphysiologie*, in *Duale Reihe Physiologie*, J. Behrends, et al., Editors. 2016, Georg Thieme Verlag.
103. Marti, H., *Leistungsphysiologie*, in *Taschenlehrbuch Physiologie*, M. Gekle, et al., Editors. 2015, Georg Thieme Verlag.
104. Chan, M.H., et al., *Cytokine gene expression in human skeletal muscle during concentric contraction: evidence that IL-8, like IL-6, is influenced by glycogen availability*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2004. **287**(2): p. R322-7.

105. Nieman, D.C., et al., *Carbohydrate ingestion influences skeletal muscle cytokine mRNA and plasma cytokine levels after a 3-h run*. J Appl Physiol (1985), 2003. **94**(5): p. 1917-25.
106. Ostrowski, K., et al., *Chemokines are elevated in plasma after strenuous exercise in humans*. Eur J Appl Physiol, 2001. **84**(3): p. 244-5.
107. Nieman, D.C., et al., *Cytokine changes after a marathon race*. J Appl Physiol (1985), 2001. **91**(1): p. 109-14.
108. Nieman, D.C., et al., *Influence of vitamin C supplementation on oxidative and immune changes after an ultramarathon*. J Appl Physiol (1985), 2002. **92**(5): p. 1970-7.
109. Tan, S.J., et al., *High-intensity physical exercise increases serum alpha-klotho levels in healthy volunteers*. J Circ Biomark, 2018. **7**: p. 1849454418794582.
110. Rahimi, S., K. Khademvatani, and M.R. Zolfaghari, *Association of circular Klotho and insulin-like growth factor 1 with cardiac hypertrophy indexes in athlete and non-athlete women following acute and chronic exercise*. Biochem Biophys Res Commun, 2018. **505**(2): p. 448-452.
111. van Loon, E.P., et al., *Shedding of klotho by ADAMs in the kidney*. Am J Physiol Renal Physiol, 2015. **309**(4): p. F359-68.

Anhang 2 Ausschlusskriterien: Bei einem zutreffendem Ausschlusskriterium wurde der Proband von der Teilnahme ausgeschlossen

- Instabile Angina pectoris-Beschwerden und trainingsinduzierte A.p.
- Schwerer Schwindel
- Unkontrollierter Diabetes mellitus
- Knochenbruch in den letzten 12 Wochen
- OP an den Extremitäten in den letzten 6 Wochen
- Akuter Herzinfarkt in den letzten 6 Monaten
- Symptomatische Herzrhythmusstörungen und/oder eingeschränkte Pumpfunktion
- Höhergradiger AV-Block
- Dokumentierte Herzklappenprobleme (Insuffizienz oder Stenose)
- Herzinsuffizienz
- Akute Myokarditis/Perikarditis
- Hypertrophe Kardiomyopathie oder andere Einschränkung der Ausflussbahn des Herzens
- Unkontrollierter arterieller Bluthochdruck (>200 mmHg SYS, >110 mmHg DIA)
- Thrombembolien in den letzten 3 Monaten
- Symptomatische schwere Aortenstenose
- Symptomatische oder dokumentierte Stenose von peripheren Arterien
- Dokumentierte arterielle Aneurysmen
- Akute Aortendissektion
- Schweres Asthma bronchiale
- Akute Lungenembolie in den letzten 6 Monaten
- Akute Infektion
- Sonstiges Risiko, das gegen die Teilnahme am Test spricht

Anhang 3 Abbruchkriterien: Beim Auftreten einer der Kriterien, kam es zum Abbruch des Fahrradergometertests

- Herzfrequenz über Maximaler Hf ($220 - \text{Alter}$)
- Blutdruckabfall >10 mmHg (im Vergleich zum Basalwert)
- Hypertensive Dysregulation (symptomabhängig)
- (subjektive) Erschöpfung des Probanden
- Pedalfrequenz unter 50 U/min für über 30 Sekunden
- Angina pectoris Symptome
- Schwere Dyspnoe
- Zyanose (klinisches Zeichen für ungenügende Durchblutung)
- EKG-Veränderungen:
 - ST-Senkung ≥ 3 mm
 - ST-Hebung ≥ 1 mm
 - Über 30 Sekunden andauernde ventrikuläre Tachykardie
 - Polymorphe Extrasystolen, pairs, bursts
 - Supraventrikuläre Tachykardie
 - Bradyarrhythmie
 - Leitungsstörungen (AV-Block, Schenkelblock)
- Technische Schwierigkeiten (z.B. defektes EKG-Gerät)

8 Danksagung

Zuallererst möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Franz Jakob, für die Bereitstellung des Themas und die stetige, kompetente und überaus hilfreiche Betreuung dieser Arbeit danken. Ebenso geht mein Dank an meine Zweitbetreuerin, Frau Dr. Sigrid Müller-Deubert, die mich zu zahlreichen Gelegenheiten unterstützt und für all meine Fragen ein offenes Ohr hatte.

Außerdem wäre diese Arbeit ohne die Unterstützung durch die Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen des *Orthopädischen Zentrums für Muskuloskelettale Forschung, Würzburg*, insbesondere durch Doris Schneider nicht realisierbar gewesen. Ich danke dem ganzen Team für die freundliche Arbeitsatmosphäre und der stetigen Hilfsbereitschaft, mir auch die kleinste Frage zu beantworten.

Des Weiteren gilt mein Dank auch den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Klinischen Studieneinheit des König-Ludwig-Haus, die bei der Vorbereitung und Durchführung der Studie eine wichtige Rolle gespielt haben. Ich will auch allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen bei Predia danken, die mich bei der praktischen Durchführung der Studie unterstützt haben.

Weiterer Dank gilt meiner Familie, meiner Freundin und meinen Freunden, die mir mit dem ein oder anderen Tipp zur Seite standen und mir durch einige schwierige Phasen geholfen haben.

Zu guter Letzt geht mein Dank an alle Freunde und Bekannte, die sich freiwillig für diese Studie als Probanden zur Verfügung gestellt haben und ohne die diese ganze Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Frederik Paul Vincent Glöckner

Geburtsdatum: 26. Juli 1992

Geburtsort: Würzburg

Schulische/ Universitäre Ausbildung

Seit 4/19 Promotionsstudium Humanmedizin
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

17.12.2018 Approbation als Arzt

04/12 – 3/19 Studium der Humanmedizin
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

2003 – 2011 Friedrich-Koenig-Gymnasium, Würzburg

1999 – 2003 Ernst-Keil-Schule, Höchberg

Studienbegleitende Praktika

11/17 – 10/18 Praktisches Jahr
Anästhesie: Klinikum Würzburg Mitte, Standort Juliusspital
Innere Medizin: Klinikum Wilhelmshaven
Chirurgie: Klinikum Würzburg Mitte, Standort Juliusspital

03/17 – 04/17 Famulatur im Juliusspital Würzburg
Abteilung Unfallchirurgie

02/16 – 03/16 Famulatur in Tagesklinik Ringparkcenter, Würzburg
Anästhesist/ LNA Dr. Jaraus

09/15 – 10/15 Famulatur in Praxis Dres. Schauber/Hirtl, Veitshöchheim
Praxis für Allgemeinmedizin, Sportmedizin, Chirotherapie,
Naturheilkunde und Akupunktur

03/2015

Famulatur Klinik Kitzinger Land
Station für Innere Medizin